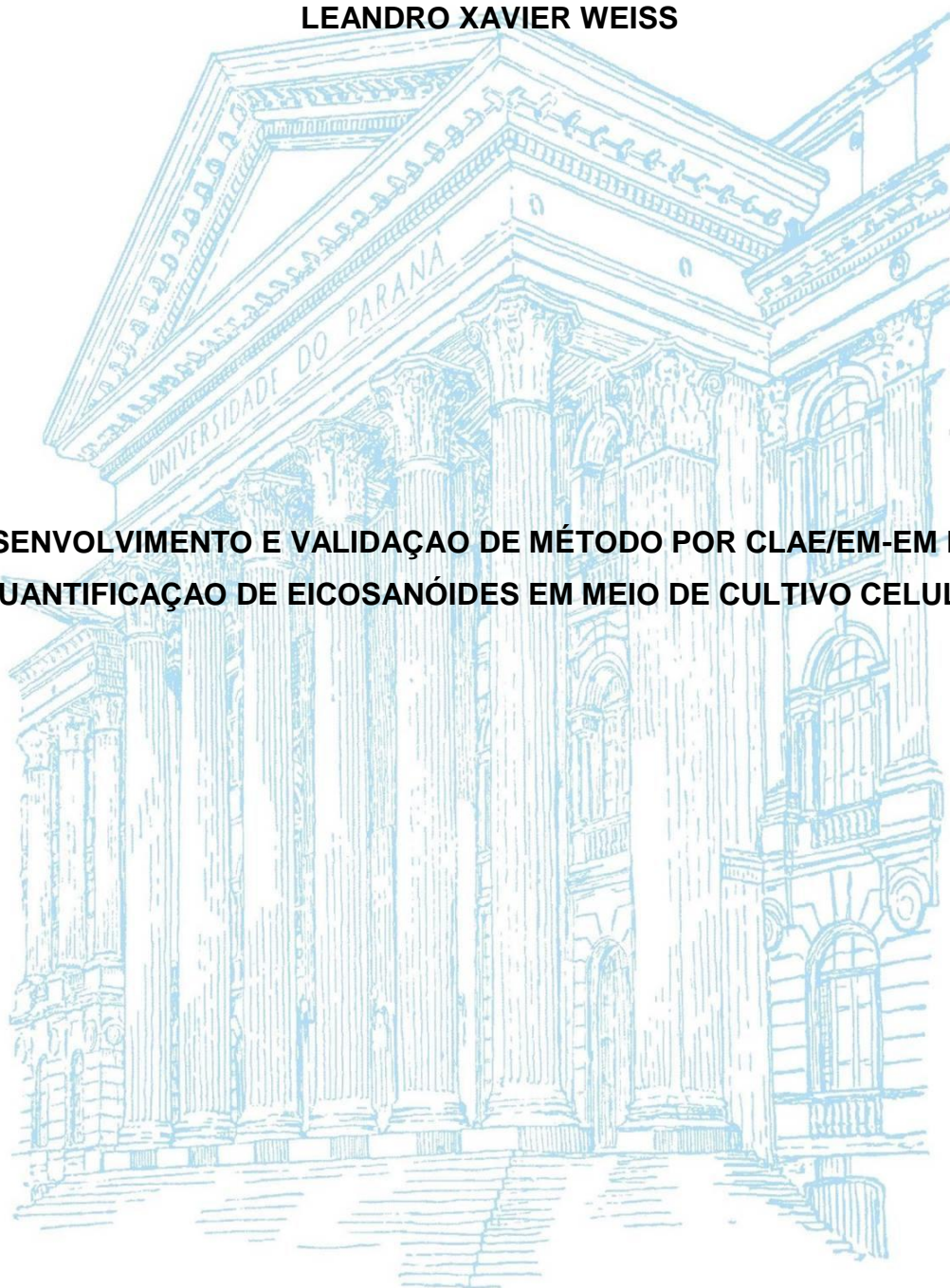


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEANDRO XAVIER WEISS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE/EM-EM PARA
QUANTIFICAÇÃO DE EICOSANÓIDES EM MEIO DE CULTIVO CELULAR**



**CURITIBA
2016**

LEANDRO XAVIER WEISS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE/EM-EM PARA
QUANTIFICAÇÃO DE EICOSANÓIDES EM MEIO DE CULTIVO CELULAR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos, linha de pesquisa Produção e Qualidade, do setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof^o. Dr^o. Roberto Pontarolo

Co-orientador: Dr. Cléverson Antônio Ferreira
Martins

**CURITIBA
2016**

Weiss, Leandro Xavier

Desenvolvimento e validação de método por CLAE/EM-EM para quantificação de eicosanóides em meio de cultivo celular / Leandro Xavier Weiss – Curitiba, 2016
111 f. : Il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Coorientador: Professor Dr. Cléverson Antonio Ferreira Martins

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2016

Inclui bibliografia

1. DMEM. 2. Eicosanóides. 3. RAW 264.7. 4. CLAE/EM-EM. I. Pontarolo, Roberto.
II. Martins, Cléverson Antonio Ferreira. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.19

TERMO DE APROVAÇÃO

LEANDRO XAVIER WEISS

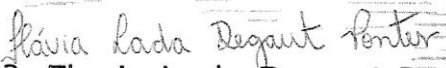
Título: "Desenvolvimento e validação de método por CLAE-EM/EM para quantificação de eicosanóides em meio de cultivo celular"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador


Prof. Dr. Cleverson Antonio Ferreira Martins
Co-orientador


Profª. Dra. Thalita Gilda Santos Benghi
Centro Universitário Autônomo do Brasil – UniBrasil


Dra. Flavia Lada Degaut Pontes
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 01 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Atrás de grandes pessoas sempre estiveram outras grandes pessoas. Ao final de uma jornada de tanto aprendizado chega à hora de agradecer a todos estes gigantes que de alguma forma fizeram parte desta caminhada.

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador, professor Dr. Roberto Pontarolo, pelas palavras de incentivo, de cobrança, de reconhecimento, de conforto e principalmente de sabedoria. Enfim, por saber o real significado da palavra orientador. Muito obrigado por tudo!

Ao Neese, por seus ensinamentos nipônicos sobre a validação e suas habilidades em exterminar percoladores. Sua ajuda foi de essencial importância para a realização deste trabalho.

À minha família. Pelo seu apoio, durante toda a minha vida, tanto financeiramente quanto emocional. O incentivo e apoio de modo incondicional que recebi nunca serão esquecidos e com certeza terei valores em que acreditar para o resto da minha vida. Vocês são minha inspiração de vida, eu amo vocês...

Ao meu grande amigo Ricardo, pela parceira, companheirismo e pelas horas perdidas no HG. Valeu por tudo cara, nossa amizade será levada para sempre. Conte comigo no que precisar.

Ao Johnny pelo seu conhecimento sobre desenvolvimento de métodos, sem sua ajuda nada disso seria possível.

À Flávia pela ajuda recebida na etapa final de meu trabalho. Apesar dos tropeços no decorrer, o que fica é a lembrança de uma pessoa sempre disposta a me ajudar.

Aos meus amigos do CEB: Cleverson, Letícia, Leti, Thaís, Breno, Raquel, Mari, Wilton. Agradeço a parceria, as risadas e as companhias de R.U. Sem vocês seria muito mais monótona esta pequena grande jornada.

Agradeço a contribuição da doutoranda Ana Carolina Irioda. Seu conhecimento com cultivos celulares foi a etapa crucial deste trabalho. Obrigado por sua paciência e disposição em realizar uma etapa de meu trabalho juntamente contigo.

Agradeço também a alguns professores que contribuíram e ajudaram de forma bastante significativa: Dr^a. Tania Maria Bordin Bonfim, Dr^a Jane Manfron Budel

À CAPES, pelo apoio financeiro em forma de bolsa de estudos.

“Hay que endurecerse, pero sin perder La ternura jamás.”

Ernesto Rafael Guevara de La Serna

RESUMO

A inflamação é uma resposta fisiológica natural do organismo à infecção, dano e ou stress celular, agindo como um mecanismo de defesa para remover e reparar o tecido danificado. Quimicamente este processo é modulado por mediadores inflamatórios, dentre eles os ácidos graxos insaturados derivados do ácido araquidônico denominados eicosanóides. A detecção e quantificação destes compostos é de grande interesse porque eles estão envolvidos em uma série de doenças, incluindo asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença cardiovascular, câncer, entre outras. A cromatografia líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) tem emergido como uma das principais técnicas utilizadas para quantificar estes mediadores. Neste trabalho, um método foi desenvolvido e validado para a análise simultânea de cinco eicosanóides em meio de cultivo celular utilizando células RAW 264.7, e a técnica de CLAE-EM/EM. As separações cromatográficas foram realizadas em coluna ZORBAX Eclipse XDB, C-18 (4,6 x 50 mm 1,8 μ m) a temperatura de 40 °C, e uma fase móvel, contendo água e acetonitrila ambas com ácido fórmico a 1%. O modo de eluição utilizado foi gradiente com um fluxo de 700 μ L.min⁻¹. As amostras foram preparadas por extração líquido-líquido da matriz (meio DMEM) sem passos adicionais de limpeza. O método foi validado conforme normas nacionais e internacionais para métodos bioanalíticos e mostrou-se ser seletivo, sensível (limite de detecção em 1 ng.mL⁻¹ e limite de quantificação em 5 ng.mL⁻¹ para todos os compostos), linear ($r^2 > 0,99$, preciso (ER < 7%), exato (CV < 13%) e livre de efeitos residual e matriz (FMN > 1,25 \pm 0,07). De acordo com o estudo de estabilidade os analitos são estáveis na matriz à temperatura ambiente durante 3 h. O ensaio de estabilidade pós-processamento indicou que as amostras armazenadas no injetor a 3 ° C mantêm-se estáveis por 5 horas. Os analitos também mostraram-se estáveis por 3 horas a 22°C em solução e por 20 dias a -40°C em solução e em matriz. Não houve degradação significativa em três ciclos de congelamento e descongelamento. Este novo método permite a quantificação dos metabolitos do ácido araquidônico (PGE₂, PGD₂, 6-CETO-PGF_{1 α} , PGF_{2 α} e TXB₂) a partir de meio de cultivo DMEM utilizando células RAW 264.7, sem derivatização ou passos laboriosos de purificação (EFS). Este método pode ser aplicado para avaliar a atividade anti-inflamatória de extratos de plantas utilizando cultivo de células.

Palavras-chave: DMEM; Eicosanóides; RAW 264.7; CLAE-EM/EM

ABSTRACT

Inflammation is the body's natural physiological response to infection or injury, acting as a defense mechanism to remove and repair damaged tissue. Chemically this process is modulated by inflammatory mediators such as eicosanoids, which are oxygenated, endogenous, unsaturated fatty acids derived from arachidonic acid. Detection and quantification of these compounds are of great interest because they play important roles in a number of significant diseases, including asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cardiovascular disease, cancer among others. High-performance liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS) has emerged as one of the main techniques used to quantify these mediators. In this work a validated method is described for the simultaneous analysis of five eicosanoids from cultured cells using liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS). Chromatographic separations were achieved on an ZORBAX Eclipse XDB C-18 column (4,6 x 50 mm 1.8 μm) maintained at 40 °C. The mobile phase was eluted at 700 $\mu\text{L min}^{-1}$ in gradient mode between Water/Acetonitrile both containing 1% formic acid. The samples were prepared by liquid-liquid extraction of the matrix (DMEM medium) without additional cleanup steps. The method was validated according to national and international guidances, and shown to be sensitive (limit of detection at 1 ng.mL^{-1} and limit of quantitation at 5 ng.mL^{-1} for all compounds), linear ($r^2 > 0,99$), free of residual and matrix (FMN $> 1,25 \pm 0,07$) effects, accurate (RE $< 7\%$) and precise (RSD $< 13\%$). The stability study demonstrated that the analytes are stable in matrix at room temperature for 3h. The post-processing stability assay revealed that the samples stored in the sample manager at 3°C can be maintained for 5 hours prior to injection. Under the evaluated conditions, the analytes and IS also demonstrated stability in solution for 3 hours at room temperature, and -40°C for 20 days. The freeze-thaw cycles assay showed that there was no significant degradation in three defrost cycles. This new method permits quantification of selected individual arachidonic acid metabolites from RAW 264.7 cell culture medium (DMEM), without derivatization or laborious purification steps (SPE) and shown to be applicable to evaluate the anti-inflammatory activity of plants extracts using cell culture.

Keywords: DMEM; Eicosanoids; RAW 264.7; LC-MS/MS

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 -	CÁLCULO DA PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS DO MÉTODO EXTRATIVO	51
EQUAÇÃO 2 -	CÁLCULO DO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO UTILIZADO NO ENSAIO DE PRECISÃO	64
EQUAÇÃO 3 -	CÁLCULO DO ERRO RELATIVO UTILIZADO NO ENSAIO DE PRECISÃO	64
EQUAÇÃO 4 -	CÁLCULO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO POR PADRÃO INTERNO (FMN)	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	GRADIENTE CROMATOGRÁFICO UTILIZADO NO MÉTODO FINAL PARA DETECÇÃO E DOSEAMENTO DE EICOSANÓIDES EM MATRIZ DE CÉLULAS RAW 264.7 E MEIO DE CULTIVO DMEM.	58
TABELA 2 -	TRANSIÇÕES MRM UTILIZADAS NA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS <i>TANDEM</i> PARA COMPOSTOS EICOSANÓIDES	59
TABELA 3 -	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	61
TABELA 4 -	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE	62
TABELA 5 -	PARÂMETROS DE VOLTAGEM OTIMIZADOS ATRAVÉS DE <i>MRM</i> PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ , 6-keto-PGF _{1α} e PGB ₂ -d4	71
TABELA 6 -	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL, DESENVOLVIDO POR MARTINS (2013)	73
TABELA 7 -	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL PARA COLUNA ZORBAX Eclipse XDB C-18 4,6 x 150 mm 1.8 μm COM BASE EM MÉTODO PROPOSTO POR MARTINS (2013).	74
TABELA 8 -	SEGUNDO GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL PARA COLUNA ZORBAX Eclipse XDB C-18 4,6 x 150 mm 1.8 μm	75
TABELA 9 -	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL PARA COLUNA ZORBAX XDB C-18 4,6 x 50 mm 1.8μm	79
TABELA 10 -	SEGUNDO GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL PARA COLUNA ZORBAX XDB C-18 4,6 x 50 mm 1.8μm	79
TABELA 11 -	COMPARATIVO ENTRE AS PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO PARA A PGE ₂ , PGD ₂ , 6-CETO-PGF _{1α} , PGF _{2α} , E TXB ₂ ENTRE AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS) E A EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL)	83
TABELA 12 -	VALORES DE LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO PARA A PGE ₂ , PGD ₂ , 6-CETO-PGF _{1α} , PGF _{2α} , E TXB ₂	85
TABELA 13 -	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGE ₂	87
TABELA 14 -	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGD ₂	88

TABELA 15 -	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGF _{2α}	89
TABELA 16 -	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 6-CETO-PGF _{1α}	90
TABELA 17 -	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA TXB ₂	91
TABELA 18 -	VARIAÇÃO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO POR PADRÃO INTERNO (FMN) DE PGE ₂ , PGD ₂ , TXB ₂ , PGF _{2α} E 6-CETO-PGF _{1α} CALCULADO PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ	94
TABELA 19 -	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS ATRAVÉS DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS POR CLAE-EM/EM	95
TABELA 20 -	ESTABILIDADE DA PGE ₂ , PGD ₂ E TXB ₂ NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO (n = 6)	97
TABELA 21 -	ESTABILIDADE DA PGF _{2α} , 6-CETO-PGF _{1α} E PGB ₂ -D4 NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO (n = 6)	98

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PRINCIPAIS AÇÕES FISIOLÓGICAS DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS: PGD ₂ , PGE ₂ , PGF _{2α} , PGI ₂ , PGE ₁ , PGF _{1α} , TXA ₂ , LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ QUANDO LIGADAS AOS SEUS RECEPTORES CARACTERÍSTICOS	29
QUADRO 2 - MECANISMOS DE SEPARAÇÃO DE ÍONS PELOS ANALISADORES DE MASSAS MAIS COMUNS USADOS EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS	42
QUADRO 3 - MECANISMOS DE DETECÇÃO DE ÍONS PELOS DETECTORES DE MASSAS USADOS EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS	44
QUADRO 4 - CONDIÇÕES EMPREGADAS NOS TESTES DE RECUPERAÇÃO DE PGE ₂ , PGD ₂ , 6-CETO-PGF _{1α} , PGF _{2α} E TXB ₂ EM MEIO DE CULTIVO CELULAR, UTILIZANDO EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.	52
QUADRO 5 - RELAÇÃO DAS COLUNAS TESTADAS NO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE EICOSANÓIDES EM MEIO DE CULTIVO DE CÉLULAS RAW 264.7.	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO	23
FIGURA 2 -	CAMINHOS DE METABOLIZAÇÃO DO AA	24
FIGURA 3 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO TROMBOXANO A ₂	24
FIGURA 4 -	ESTRUTURA QUÍMICA DAS PROSTAGLANDINAS PGE ₂ , PGD ₂ , PGI ₂ e PGF _{2α}	25
FIGURA 5 -	VIA DE METABOLIZAÇÃO DO AA POR MEIO DA COX	26
FIGURA 6 -	CAMINHOS DE METABOLIZAÇÃO DO AA POR MEIO DA LIPOXIGENASE	31
FIGURA 7 -	CAMINHOS DE METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO POR MEIO DO CITOCROMO P450	32
FIGURA 8 -	ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DA IONIZAÇÃO POR <i>Eletrospray</i> (ESI)	41
FIGURA 9 -	ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DE UM DETECTOR DE MASSAS DO TIPO MULTIPLICADOR DE ELÉTRONS	45
FIGURA 10 -	ASPECTO FENOTÍPICO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM RAW 264.7 UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS	70
FIGURA 11 -	ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO POR DIMS DE PGE ₂ , PGD ₂ , 6-CETO-PGF _{1α} , PGF _{2α} E TXB ₂ A 250 ng.ml ⁻¹ UTILIZANDO ACETONITRILA:ÁGUA 50:50 (V:V) CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO.	71
FIGURA 12 -	CROMATOGRAMA INICIAL OBTIDO POR CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX SB-C18 4,6 X 150 mm 1,8μm E GRADIENTE DESCRITO NA TABELA 6.	75
FIGURA 13 -	CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX SB-C18 4,6 X 150 mm 1,8μm E GRADIENTE DESCRITO NA TABELA 7.	76
FIGURA 14 -	CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX SB-C18 4,6 X 150 mm 1,8μm COM ADIÇÃO DE 0,25% DE ÁCIDO FÓRMICO NA FASE MÓVEL.	77
FIGURA 15 -	FORMAS TAUTOMÉRICAS DO TROMBOXANO B ₂ (TXB ₂ PARA 2,3-DINOR-TXB ₂).	77
FIGURA 16 -	FIGURA 15 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX SB-C18 4,6 X 150 mm 1,8μm E MANTENDO O FORNO DE COLUNA EM 50°C.	78

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA APÓS DESENVOLVIMENTO FINALIZADO OBTIDO POR CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX SB-C18 4,6 X 50 mm 1,8µm.	80
FIGURA 18 - CLAE-EM/EM DE AMOSTRA OBTIDA POR MEIO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (MARTINS, 2012).	81
FIGURA 19 - CLAE-EM/EM DE AMOSTRA OBTIDA POR MEIO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	82
FIGURA 20 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) PARA AVALIAR A SELETIVIDADE DO MÉTODO NAS TRANSIÇÕES MONITORADAS DE PGE ₂ , PGD ₂ , 6-CETO-PGF _{1α} , PGF _{2α} , TXB ₂ e PGB ₂ -d4.	84
FIGURA 21 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGE ₂ , EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x.	87
FIGURA 22 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGD ₂ , EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x.	88
FIGURA 23 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGF _{2α} , EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x.	89
FIGURA 24 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 6-CETO-PGF _{1α} , EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x.	90
FIGURA 25 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA TXB ₂ , EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x.	91
FIGURA 26 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) PARA O ESTUDO DO EFEITO RESIDUAL PGE ₂ e PGD ₂ .	92
FIGURA 27 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) PARA O ESTUDO DO EFEITO RESIDUAL 6-CETO_PGF _{1α} e TXB ₂ .	93
FIGURA 28 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) PARA O ESTUDO DO EFEITO RESIDUAL PGF _{2α} e PGB ₂ -d4.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	- Ácido Araquidônico
AFO	- Ácido Fórmico
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMP _c	- Adenosina monofosfato cíclica
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	- Ionização Química à Pressão Atmosférica
°C	- Graus Celsius
CAD	- Gás de colisão
CE	- Energia de colisão
CEP	- Potencial de Entrada da célula de colisão
CG	- Cromatografia Gasosa
CG-EM	- Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG-EM/EM	- Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas <i>Tandem</i>
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	- CLAE acoplado à espectrometria de massas <i>Tandem</i>
CLAE-UV	- CLAE acoplado à Ultra Violeta
CO ₂	- Gás Carbônico
COX	- Ciclooxygenase
COX-1	- Ciclooxygenase isoforma 1
COX-2	- Ciclooxygenase isoforma 2
COX-3	- Ciclooxygenase isoforma 3
CQ	- Amostras de controle de qualidade
CQB	- Amostra de controle de qualidade de baixa concentração
CQM	- Amostra de controle de qualidade de média concentração
CQA	- Amostra de controle de qualidade de alta concentração
CQD	- Amostra de controle de qualidade de diluição
cPLA ₂	- Fosfolipase A2 citosólica
Cps	- Contagens por segundo
CUR	- Gás de Curtina
CV%	- Coeficiente de Variação
CXP	- Potencial da célula de saída
Cyp	- Citocromo-oxidase
DiHETEs	- Ácidos dihidroxieicosatrienólicos
DMEM	- Meio Eagle modificado por Dulbecco
DP	- Potencial de desagregação
DP	- Desvio padrão
DPR	- Desvio Padrão Relativo
DT	- <i>Dwell time</i>
EETs	- Ácidos epoxieicosatrienólicos
EFS	- Extração em Fase Sólida
ELL	- Extração líquido-líquido

EM	- Espectrômetro de Massas
EP	- Potencial de entrada
ER%	- Erro relativo
ESI	- <i>Eletrospray</i>
FAP	- Fator de agregação plaquetária
FIA	- Análise por Injeção em Fluxo
FLAP	- Proteína Ativadora de 5-lipooxigenase
FMN	- Fator de matriz normalizado por padrão interno
g	- grama
GS1	- Gás de Nebulização
GS2	- Gás Secante
HETEs	- Ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos
ICAM-1	- molécula de adesão intercelular 1
IL-1	- Interleucina 1
IL-6	- Interleucina 6
IFN- γ	- Interferon-gama
Kg	- Quilograma
LD	- Limite de detecção
LQ	- Limite de quantificação
LIQ	- Limite inferior de quantificação
LPS	- Lipopolissacarídeo
LSQ	- Limite superior de quantificação
LOX	- Lipooxigenase
MALDI	- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
mL	- Mililitro
MPO	- Mieloperoxidase
MRM	- Monitoramento de Reações Múltiplas
m/z	- Relação massa/carga
NAG	- N-acetil-glicosaminidase
IL	- Interleucina
IS	- Voltagem do capilar
PBS	- Tampão fosfato-salino
PGs	- Prostaglandinas
PGE ₂	- Prostaglandina-E2
PGD ₂	- Prostaglandina-D2
PGI ₂	- Prostaglandina-I2
PGG ₂	- Prostaglandina-G ₂
PGH ₂	- Prostaglandina-H ₂
PGF _{2α}	- Prostaglandina-F2 alfa
pH	- Potencial Hidrogeniônico
PI	- Padrão interno
6-ceto-PGF _{1α}	- 6 ceto-prostaglandina-F1 alfa
TEM	- Temperatura da fonte de ionização
TNF- α	- Fator de necrose tumoral
TXA ₂	- Tromboxano-A2
TXB ₂	- Tromboxano-B2
LTA ₄	- Leucotrieno-A4
LTB ₄	- Leucotrieno-B4

LTC ₄	- Leucotrieno-C4
LTD ₄	- Leucotrieno-D4
LTE ₄	- Leucotrieno-E4
LTF ₄	- Leucotrieno-F4
PGB ₂ -d4	- Prostaglandina-B2 deuterada
PLA2	- Fosfolipase A2
p:p	- peso:peso
p:v	- peso:volume
Q1	- Fragmento 1
Q3	- Fragmento 2
R	- Coeficiente de correlação linear
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RE	- Resolução Específica
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
rpm	- Rotações por minuto
SFB	- Soro Fetal Bovino
TBME	- Terc-Butil-Metil-Éter
TXs	- Tromboxanos
UV	- Ultra violeta
V	- Volts
VCAM-1	- Molécula de adesão celular vascular 1
µg	-Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 INFLAMAÇÃO	22
3.1.1 Mediadores químicos da inflamação do tipo eicosanóide	23
3.1.2 A via das cicloxigenases (COX)	24
3.1.3 A via das lipoxigenases (LOX)	30
3.1.4 A via do citocromo P450	31
3.1.5 A estabilidade dos mediadores inflamatórios	32
3.2 MACRÓFAGOS E AS CÉLULAS RAW 264.7	33
3.3 CULTIVOS CELULARES	34
3.3.1 Tipos de culturas	35
3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DE MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO DO TIPO EICOSANÓIDE	36
3.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)	39
3.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS	45
3.7.1 Seletividade	46
3.7.2 Linearidade	46
3.7.3 Precisão	47
3.7.4 Exatidão	48
3.7.5 Limite de detecção (LD)	48
3.7.6 Limite de quantificação (LQ)	49

3.7.7 Estabilidade	49
3.7.9 Efeito matriz.....	50
3.7.10 Efeito residual	50
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE EICOSANÓIDES DO MEIO DE CULTIVO CELULAR.....	51
4.2EXTRAÇÃO DOS EICOSANÓIDES DO CULTIVO CELULAR.....	52
4.2.1 Extração líquido-líquido	53
4.2.2 Extração em fase sólida.....	53
4.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE PGE ₂ , PGD ₂ , 6-CETO-PGF _{1α} , PGF _{2α} , E TXB ₂ POR CLAE-EM/EM.....	54
4.3.1 Instrumentação	54
4.3.2 Preparo de padrões	55
4.3.3 Desenvolvimento do método por CLAE-EM/EM	56
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	59
4.4.1 Limites de detecção e quantificação	59
4.4.2 Linearidade.....	60
4.4.3 Seletividade	61
4.4.4 Amostras de controle de qualidade.....	62
4.4.6 Precisão e exatidão	63
4.4.7 Efeito matriz.....	64
4.4.8 Testes de estabilidade em matriz	65
4.4.9 Testes de estabilidade em solução	67
4.5 CULTIVO CELULAR DE RAW 264.7	68
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1 CÉLULAS RAW 264.7	69
5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE-EM/EM	70
5.3 EXTRAÇÃO	81

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	83
5.4.1 Seletividade	83
5.4.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	85
5.4.3 Linearidade.....	85
5.4.4 Efeito Residual	92
5.4.5 Efeito matriz.....	94
5.4.6 Precisão e exatidão	94
5.4.7 Estabilidade	96
6. CONCLUSÃO	99
7. REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa de nosso organismo, que frente a infecções, dano, e ou stress celular, é ativado e possui a função de manter a homeostase do organismo (ROSENBLAT et al., 2014).

Quatro sinais clínicos clássicos caracterizam o processo inflamatório, são eles: Dor, calor, Rubor e Edema (ROCK; KONO, 2008).

A parte química deste processo é mediada por fosfolípidos de membrana, que ao serem clivados pela ação da fosfolipase A2, dá origem ao ácido araquidônico, e que, ao servir de substrato para as lipoxigenases (LOX) e as cicloxigenases (COX), dão origem aos conhecidos mediadores inflamatórios do tipo eicosanóides (HUANG et al., 2014).

Estes mediadores inflamatórios além de produzirem uma ação inflamatória local, servem também para atrair macrófagos, células de defesa responsáveis pela liberação de citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-6) que, além de ampliarem a resposta inflamatória, atraem para o local leucócitos e linfócitos (ROSENBLAT et al., 2014).

Para identificar e quantificar tais mediadores em células *in vitro* diversas metodologias já foram descritas por diferentes autores. Estas envolvem: radioimunoensaio, enzima-imunoensaio, cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV) e cromatografia gasosa (CG). Entretanto, estes métodos convencionais apresentam pouca sensibilidade e, ou necessitam de derivatizações da amostra, o que aumenta o tempo de análise e o erro nos resultados. Neste sentido, destaca-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) pela sua alta sensibilidade e seletividade (BLEWETT et al., 2008).

Métodos recentemente publicados que utilizam a técnica de CLAE-EM/EM para quantificar eicosanóides em matrizes biológicas, requerem uma média de 13 minutos por análise. Ao longo dos anos, a técnica de CLAE foi aprimorada com o uso de colunas menores (empacotamento, diâmetro, largura), promovendo aumento da sensibilidade, melhor resolução e tempos de corridas menores. Aliado a isto a técnica extrativa líquido-líquido torna a análise simples, de menor custo e mais

rápida quando comparada a extração em fase sólida (EFS) (KORTZ; DOROW; CEGLAREK, 2014).

Neste contexto, o presente trabalho visa desenvolver e validar um método em CLAE-EM/EM para a quantificação dos seguintes mediadores da inflamação do tipo eicosanóide: PGE_2 , PGD_2 , 6-CETO- $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$ E TXB_2 , através de CLAE-EM/EM em meio de cultivo celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método bioanalítico por CLAE-EM/EM para quantificação de eicosanóides em meio de cultivo celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar diferentes técnicas para a extração dos analitos de interesse do meio de cultivo celular de células RAW 264.7;
- ✓ Otimizar os parâmetros de aquisição, dos analitos de interesse, no espectrômetro de massas bem como as melhores condições cromatográficas, para quantificação dos mediadores eicosanóides: PGE_2 , PGD_2 , 6-CETO- $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$, e TXB_2 .
- ✓ Validar o método conforme normas nacionais e internacionais para métodos bioanalíticos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa de nosso organismo que, frente a infecções, dano, e ou stress celular, é ativado e possui a função de manter nossa homeostase (ROSENBLAT *et al.*, 2014). Cada padrão de estímulo também causará um padrão de resposta celular, sendo assim, a inflamação é um processo fisiológico de defesa celular, este processo, todavia se expressado demasiadamente pode trazer malefícios para os tecidos afetados(LAURENCE, *et al.*, 2006).

A nível macroscópico este fenômeno se caracteriza por 4 sinais clínicos clássicos, são eles: dor, calor, rubor e edema. Sinais estes, que já haviam sido visualizados há mais de dois milênios, e só foram descritos por Celsius no século I d.C. (ROCK; KONO, 2008). Algum tempo depois, em 1843, Rudolf Virchow descreveu o quinto e último sinal cardinal: perda de função (GREENE *et al.*, 2009).

A inflamação, no entanto, a nível microscópico é dividida em três fases; na primeira, chamada aguda, há uma vasodilatação local e um aumento de permeabilidade celular, na segunda fase (sub-aguda) há a migração e infiltração de leucócitos e células fagocíticas no tecido afetado; na última fase, dita crônica, temos como característica uma proliferação do tecido fibroso e uma extensa degeneração celular. Esta última fase ocorre quando a inflamação aguda persiste por um período maior de tempo (LAURENCE, *et al.*, 2006).

O processo inflamatório é controlado e modulado através de uma variedade complexa de reações atreladas a mediadores químicos, muitos dos quais ainda não são totalmente conhecidos. Dentre alguns destes mediadores químicos, incluem a histamina, fator de ativação plaquetária(FAP), citocinas, bradicinina e os eicosanóides (RANG *et al.*, 2007).

3.1.1 Mediadores químicos da inflamação do tipo eicosanóide

Os eicosanóides são os principais metabólitos provenientes de reações de oxidação do ácido araquidônico (AA), este por sua vez, é essencialmente proveniente da dieta e se encontra como um ácido graxo poli-insaturado (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico), contendo 4 duplas ligações (BLEWETT *et al.*, 2008).

A Figura 1 representa a estrutura química do ácido araquidônico.

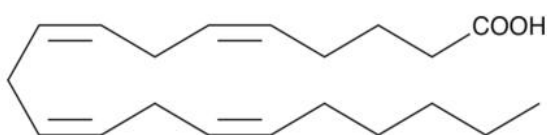


FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

FONTE: Adaptado de BLEWETT *et al.*, (2008)

Em condições normais, este composto é esterificado a fosfolipídios de membrana celular, porém frente a um estímulo patológico inflamatório, sofre a ação da fosfolipase A_2 (PLA₂), ficando livre para circular na corrente sanguínea. Posteriormente este AA liberado pode então servir de substrato para 3 vias enzimáticas; a ciclooxigenase (COX), a lipooxigenase (LOX) e o citocromo P450 (CYP) (HUANG *et al.*, 2014).

A Figura 2 ilustra a cascata de metabolização do ácido araquidônico e suas vias principais.

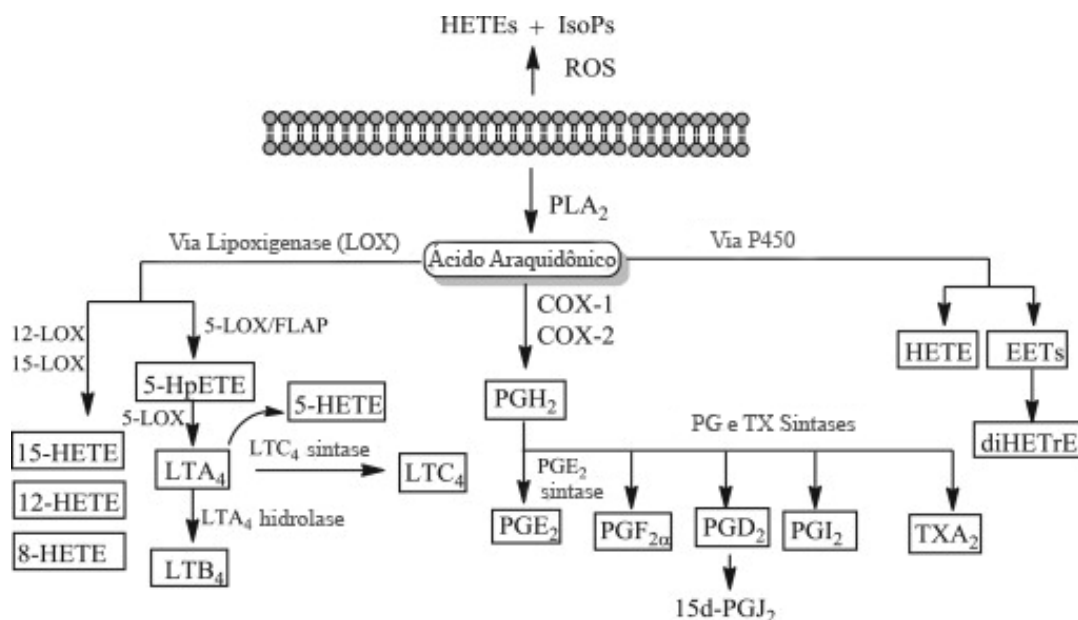


FIGURA 2 – CAMINHOS DE METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

FONTE: Adaptado de: (HUANG et al., 2014)

3.1.2 A via das cicloxigenases (COX)

A via das cicloxigenases é a responsável pela geração de prostanóides, que englobam duas classes de mediadores inflamatórios: as prostaglandinas (PGs), e os tromboxanos (TXs) (RANG *et al.*, 2007).

As estruturas químicas do tromboxano A₂ e das prostaglandinas PGE₂, PGD₂, PGI₂ e PGF_{2α} estão apresentadas nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

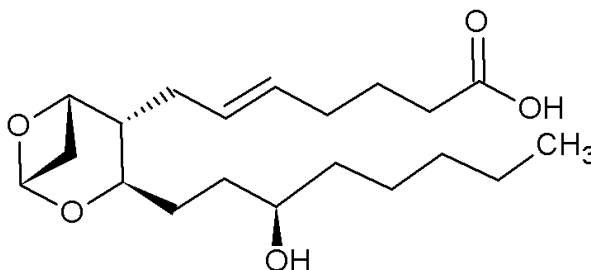


FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DO TROMBOXANO A₂

FONTE: Adaptado de: (LU et al., 2012)

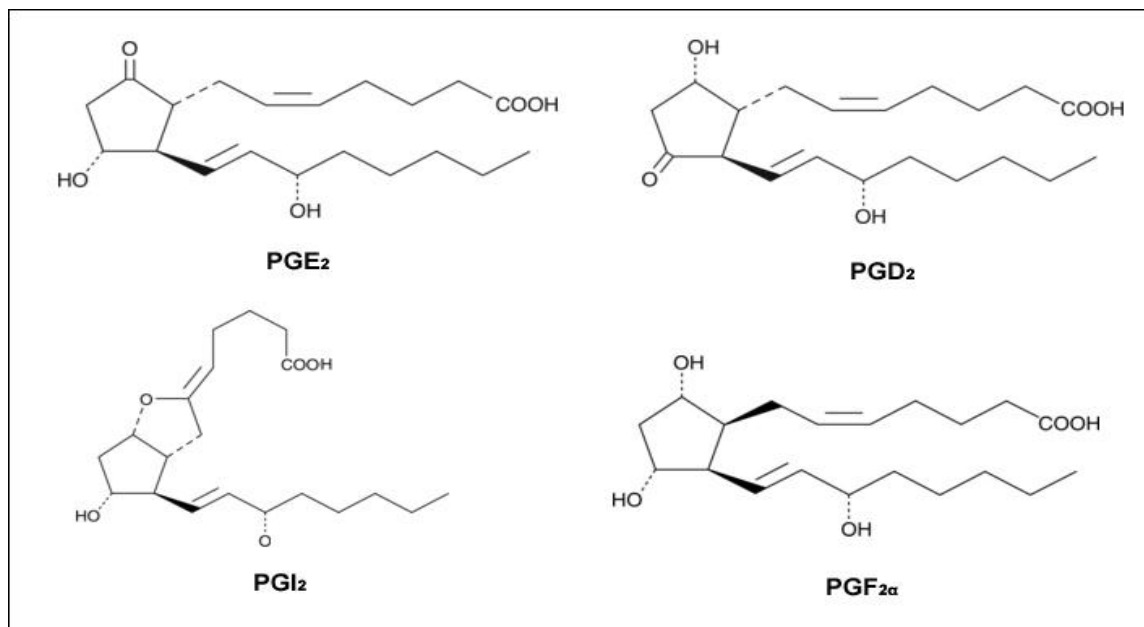


FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS PROSTAGLANDINAS PGE₂, PGD₂, PGI₂ e PGF_{2α}
FONTE: Adaptado de: BLEWETT *et al.*, (2007).

A COX é classicamente dividida em COX-1 e COX-2 e se apresenta como duas isoformas. Estas duas isoformas possuem os mesmos mecanismos catalíticos, porém, internamente na enzima, os sítios responsáveis pelas reações de ciclooxygenação e peroxidação encontram-se em regiões separadas (PILBEAM *et al.*, 2007).

Chandrasekharan e colaboradores em um estudo realizado em 2002, isolaram uma variante da COX-1 em diversos tecidos, dentre eles: tecido cardíaco canino, e córtex cerebral canino e humano. Esta variante da COX foi chamada de COX-3, e a respectiva pesquisa ajudou no processo de elucidação do mecanismo de ação do paracetamol. Este mecanismo, assim como o da COX-3, ainda está em fase de pesquisa. Desta forma permanecem parcialmente desconhecidos e não serão aprofundados neste trabalho.

A COX-1 é expressa constitutivamente em todo nosso organismo e é a responsável por uma série de eventos, que possuem a finalidade de manter a homeostase de nosso organismo (agregação plaquetária, geração de proglândinas citoprotetoras do trato gastrointestinal) (GROVER *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2011). Em contrapartida, a COX-2 é praticamente inexistente em condições normais em nosso organismo e geralmente é liberada frente a um estímulo patológico

inflamatório (YANG et al., 2011). Estes estímulos geralmente são gerados por moléculas pró-inflamatórias, como: IL-1, TNF- α , LPS e TPA (GROVER et al., 2014).

Após o estímulo e a consequente liberação das COX's no organismo humano, o ácido araquidônico, que foi clivado pela ação da PLA₂ é então metabolizado. Este metabolismo inicia-se com a produção de endoperóxidos instáveis PGG₂ (por cicloxigenação) e posteriormente PGH₂ (por peroxidação) por meio das Cicloxigenases, nome este dado em função de sua primeira reação (cicloxigenação). Esta PGH₂ é então metabolizada por prostaglandinas-sintase específicas (PILBEAM et al., 2007). Ao observarmos a Figura 5, podemos concluir que para cada metabólito PGH₂ existe também um segundo mensageiro e um tipo específico de receptor. Estes receptores ao serem ativados são responsáveis por diferentes ações no organismo.

A Figura 5 mostra a via de metabolização do ácido araquidônico por meio das Cicloxigenase, seus metabólitos, respectivos receptores e segundos mensageiros.

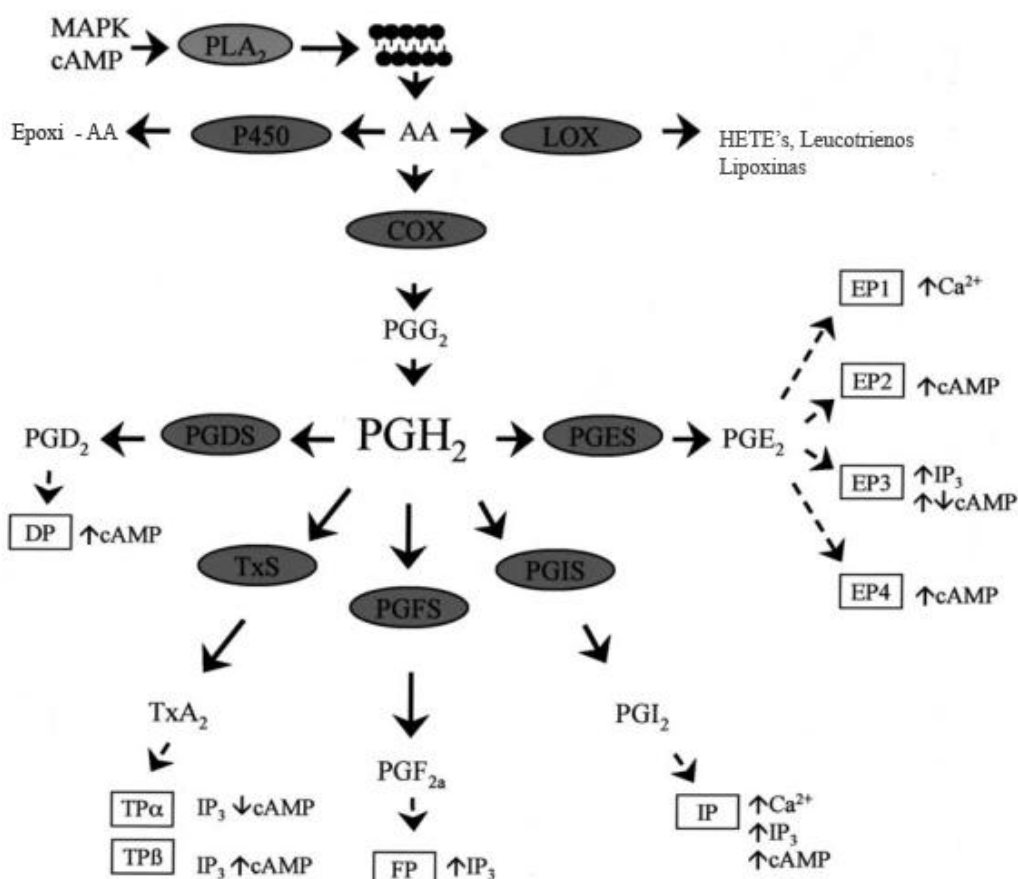


FIGURA 5 – VIA DE METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO POR MEIO DA COX

FONTE: Adaptado de: (SALES; JABBOUR, 2003)

As prostaglandinas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, incluindo contração e relaxamento da musculatura brônquica ou uterina; hipotensão; metabolismo ósseo; aumento do fluxo sanguíneo renal, resultando em diurese, natriurese, caliurese e estimulação da secreção de renina; proteção da mucosa gástrica e regulação do fluxo sanguíneo local; inibição da secreção ácida gástrica; crescimento e desenvolvimento do tecido nervoso; controle do ciclo do sono; resposta endócrina; angiogênese; progressão metastática; ejaculação, ereção e transporte de espermatozoides; parto, menstruação, fertilização e ovulação, dentre outros (MILLER, 2006; MUBARAK, 2010).

Pode-se concluir então que ações diferentes são obtidas com receptores específicos. A PGD_2 (agindo sobre receptores denominados DP) atua causando vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, relaxamento dos músculos gastrointestinal e uterino e também modificando a liberação de hormônios hipotalâmicos/hipofisários. A PGE_2 possui mais de um receptor identificado, atuando sobre o EP_1 na contração do músculo liso brônquico e gastrointestinal, sobre os EP_2 causando bronco e vasodilatação, aumento da secreção gastrointestinal e relaxamento do músculo liso gastrointestinal, e sobre os EP_3 causando contração do músculo liso intestinal, inibição da secreção ácida gástrica, aumento da secreção ácida de muco, inibição da lipólise e da liberação de neurotransmissores autonômicos e estimulação do útero gravídico. A PGE_2 ainda atua sobre receptores desconhecidos na produção de febre, inibição da proliferação das células T e ativação dos macrófagos, na liberação de esteróides supra-renais e eritropoietina pelo rim, na broncodilatação, vasodilatação e relaxamento do músculo liso intestinal. Com relação ao $PGF_{2\alpha}$, agindo sobre os receptores FP , atua principalmente na contração do miométrio em humanos. A PGI_2 age sobre os receptores IP , causando vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, liberação de renina e natriurese por efeitos sobre a reabsorção tubular de sódio (RANG *et al.*, 2007; WANG; DuBOIS, 2008; MUBARAK, 2010).

Os tromboxanos são também produzidos pela via da cicloxigenase são sintetizados a partir da prostaglandina- H_2 , através da catálise enzimática de tromboxano-sintases. O primeiro produto que surge desta reação é o tromboxano- A_2 (TXA_2), que é rapidamente convertido a tromboxano- B_2 (TXB_2) (NAKAHATA, 2008). Caracterizam-se por serem eicosanóides que se dispõem estruturalmente como sendo moléculas de 20 carbonos com um anel de seis membros fundido entre C-8 e C-12.

O tromboxano B_2 encontra-se sob duas formas em equilíbrio sendo o metabólito quimicamente estável e biologicamente inativo do Tromboxano A_2 , sendo este um potente indutor da vasoconstrição, de agregação plaquetária e do aumento da concentração de íons cálcio intracelular, que pode levar conseqüentemente a formação de trombos, se mostrando de grande importância em processos alérgicos e inflamatórios (LU et al., 2012 ; MURPHY et al., 2005). Isto se deve pois atua como regulador da quimiotaxia de neutrófilos, aumentando a dificuldade de passagem de ar pelas vias aéreas e a permeabilidade vascular nasal (SHIRASAKI *et al.*, 2007). O TXA_2 age em função de ligação em seu receptor acoplado à proteína-G (denominado *TP*) em diversos sítios no organismo, que incluem músculos lisos, plaquetas, células endoteliais, sistema nervoso central e periférico, rins e sistema imune (NAKAHATA, 2008).

Atuando nos músculos lisos, o TXA_2 tem alta atividade contratora, principalmente nos brônquios, intestino, útero e bexiga. Uma das mais importantes ações do TXA_2 é a ativação plaquetária, promovendo a agregação e conseqüente formação de trombos, que é a principal causa de infartos cerebrais e do miocárdio (KATUGAMPOLA; DAVENPORT, 2001). Nas células endoteliais, TXA_2 atua acelerando a expressão de proteínas de adesão intracelulares e vasculares (ICAM-1 e VCAM-1, respectivamente), e também moléculas de adesão de leucócitos, como a ELAM-1 (ISHIZUTA *et al.*, 1998). Outras funções nas células endoteliais do TXA_2 incluem a estimulação da migração celular e da produção de PGI_2 , a qual atenua a agregação plaquetária e contração dos músculos lisos, servindo como um regulador por *feedback* negativo (HUNT *et al.*, 1992; NIE *et al.*, 2000). Atuando no sistema nervoso, o TXA_2 realiza a modulação de liberação de hormônios e interleucinas, estimula os neurônios periféricos e está envolvido nos reflexos pulmonar e cardiovascular. (NAKAHATA, 2008). Nos rins, o TXA_2 promove mudanças no fluxo de íons, contração das células mesangiais glomerulares e dos vasos do tecido renal, além de estimular a produção de metabólitos como fator de crescimento, fibronectina, laminina e colágeno (BROWNAB; VENUTO, 1999; SPURNEY *et al.*, 1993). No sistema imune, o TXA_2 estimula a divisão de células $CD4^+$ e $CD8^+$, além de atuar na quimiotaxia de células T (NAKAHATA, 2008).

As ações específicas de cada receptor e o seu respectivo indutor são listadas no Quadro 1.

COMPOSTO	RECEPTOR	AÇÕES FISIOLÓGICAS
PGD ₂	DP	Vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, relaxamento dos músculos gastrointestinal e uterino, regulação da liberação de hormônios hipotalâmicos/hipofisários.
PGE ₂	EP ₁	Contração do músculo liso brônquico e gastrointestinal.
	EP ₂	Bronco e vasodilatação, aumento da secreção gastrointestinal e relaxamento do músculo liso gastrointestinal
	EP ₃	Contração do músculo liso intestinal, inibição da secreção ácida gástrica, aumento da secreção ácida de muco, inibição da lipólise e da liberação de neurotransmissores autonômicos e estimulação do útero gravídico.
	Desconhecido	Produção de febre, inibição da proliferação das células T, ativação dos macrófagos, liberação de esteróides supra-renais e eritropoietina pelo rim, broncodilatação, vasodilatação e relaxamento do músculo liso intestinal.
PGF _{2α}	FP	Contração do miométrio em humanos.
PGI ₂	IP	Vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, liberação de renina e natriurese por efeitos sobre a reabsorção tubular de sódio.
PGE ₁	IP, EP ₃ e EP ₄	Vasodilatação, relaxante muscular liso, gera aumento da circulação de sangue periférico, inibição da agregação plaquetária, analgésico e antitérmico, aumenta fluidez sanguínea induzindo eritrócitos a alterarem sua morfologia.
PGF _{1α}	Desconhecido	Efeito antifertilidade e luteolítico, indução da contração de músculos lisos do trato respiratório.
TXA ₂	TP _α	Vasoconstrição, broncoconstrição e indução da agregação plaquetária
	TP _β	
LTB ₄	BLT1 e BLT2	Adesão vascular e quimiotaxia
LTC ₄ LTD ₄ LTE ₄	CysLT1 e CysLT2	Broncoconstrição e aumento da permeabilidade vascular

QUADRO 1 – PRINCIPAIS AÇÕES FISIOLÓGICAS DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS: PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, PGE₁, PGF_{1α}, TXA₂, LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄ QUANDO LIGADAS AOS SEUS RECEPTORES CARACTERÍSTICOS

FONTE: Adaptado de: Rang *et al* (2007); Wang; Dubois (2008); Mubarak (2010); Iyu *et al* (2010); Blewett *et al* (2008); Montuschi *et al* (2014); Hikiji *et al* (2008)

3.1.3 A via das lipoxigenases (LOX)

Por sua vez, as lipoxigenases são responsáveis pela geração de ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos (HETEs) e leucotrienos (LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 e LTE_4), sendo o produto majoritário desta via o LTB_4 . Este, por sua vez, possui um papel importante como agente pró-inflamatório, causando adesão vascular e quimiotaxia. (BLEWETT et al., 2008; MONTUSCHI et al., 2014). O restante dos leucotrienos, chamados também de cisteinil-leucotrienos (LTC_4 , LTD_4 e LTE_4) são responsáveis por uma intensa broncoconstrição (MONTUSCHI et al., 2014).

No entanto, observou-se um aumento de todas as espécies de leucotrienos em reações anafiláticas, mostrando-se ainda indutores do aumento da permeabilidade vascular e da secreção de muco. Estes compostos atuaram contraindo as células musculares lisas, causando broncoconstrição e vasoconstrição (DE CATERINA; ZAMPOLLI, 2004). Desta forma, é possível afirmar que esta via está relacionada e exerce grande papel no desencadeamento de processos alérgicos (HUANG et al., 2014).

O pulmão é um dos órgãos que mais respondem à fabricação de leucotrienos, razão esta que confere à asma numerosos estudos relacionados ao metabolismo destes derivados do ácido araquidônico (BUCCELLATI et al., 2002; DIAMANT; BEL; DEKHUIJZEN, 1998; HOUSSEN et al., 2010).

Os leucotrienos apresentam como característica estrutural marcante a presença da unidade trieno conjugada (HAMILTON; KAROL, 1983).

São produzidos pela atividade da enzima 5-lipooxigenase, a qual é ativada pela ação do cofator “Proteína Ativadora de 5-lipooxigenase” (*FLAP*), levando primeiramente à formação de um intermediário instável denominado LTA_4 . Este pode ser então enzimaticamente convertido à LTB_4 pela LTA_4 -hidrolase ou à LTC_4 pela LTC_4 -sintase (YOKOMIZO et al., 1995). O LTC_4 dá então origem a outros leucotrienos como LTD_4 , LTE_4 e LTF_4 através da ação de enzimas da família das *peptidases*, cada qual sendo formado dependendo do tipo celular envolvido (REDDANNA et al., 2003; SURETTE et al., 2003). O grupo cisteinil-leucotrienos é assim designado em função de possuir um resíduo do aminoácido ligado no carbono

6 das suas estruturas (HOLGATE; BRADDING; SAMPSON, 1996; RANG *et al.*, 2007).

A Figura 6 mostra a via de metabolização do ácido araquidônico pela lipoxigenase, seus metabólitos e respectivas estruturas químicas.

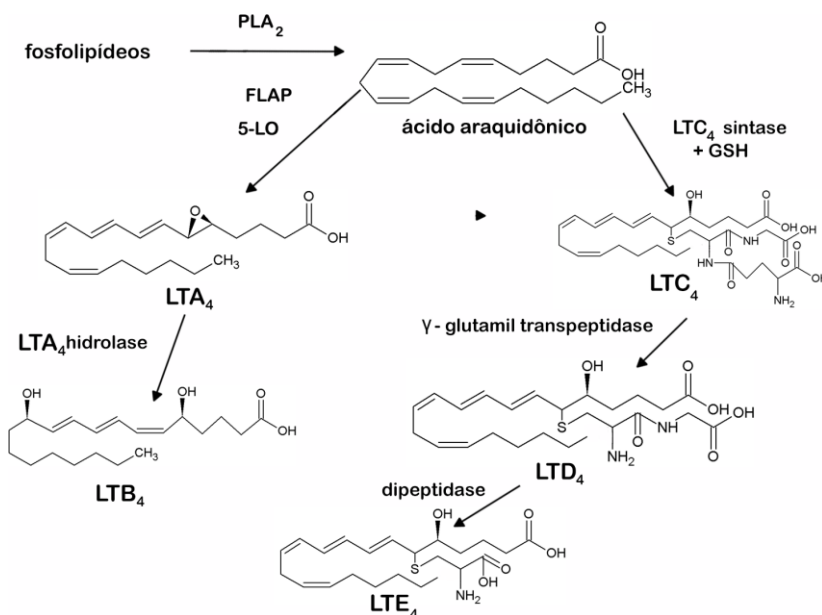


FIGURA 6 – CAMINHOS DE METABOLIZAÇÃO DO AA POR MEIO DA LIPOXIGENASE
FONTE: Adaptado de: (MONTUSCHI *et al.*, 2014)

3.1.4 A via do citocromo P450

O citocromo P450 é responsável pela geração de ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), os ácidos dihidroxieicosatrienóicos (DiHETEs) e alguns ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) (HUANG *et al.*, 2014).

A Figura 7 demonstra a via de metabolização do ácido araquidônico por meio do citocromo P450.

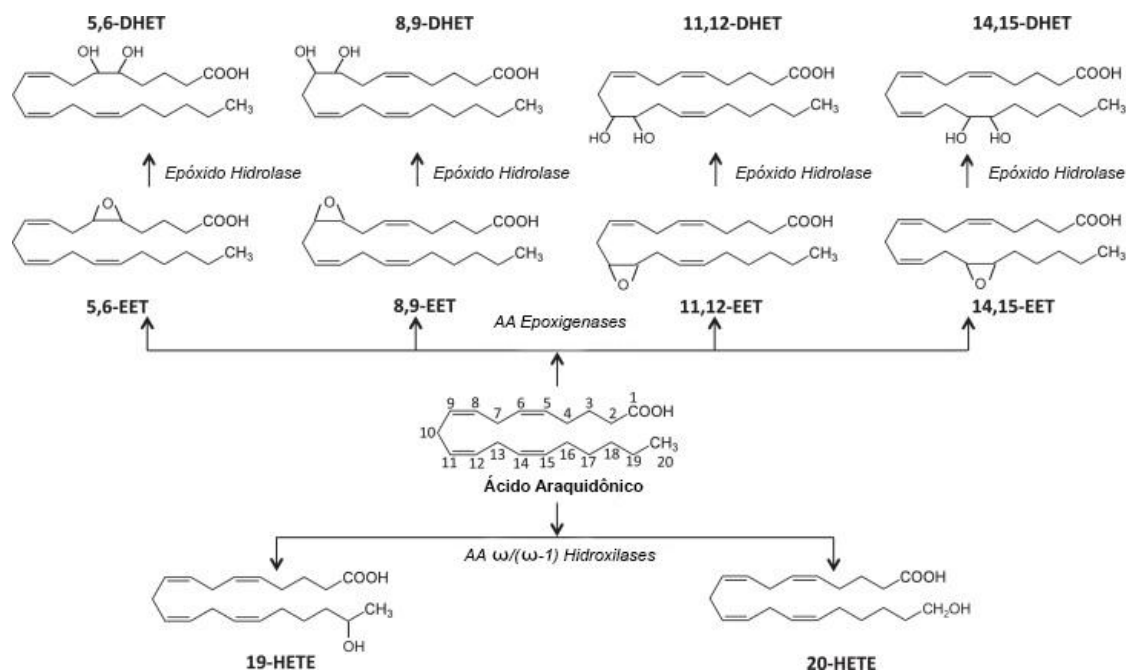


FIGURA 7– CAMINHOS DE METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO POR MEIO DO CITOCROMO P450

FONTE: Adaptado de: Edpuganti; Mehvar (2013)

Estes compostos são formados por meio de epoxidação e hidrogenação do ácido araquidônico, ambos os compostos formados por estas duas vias de metabolização são conhecidos reguladores do tônus vascular. Acredita-se que os HETEs agem como vasoconstritores, enquanto os EETs agem como vasodilatadores. Esta ação, entretanto, é do tipo tecido-dependente (EDPUGANTI; MEHVAR, 2013).

3.1.5 A estabilidade dos mediadores inflamatórios

Após analisarmos estes caminhos de metabolização do ácido araquidônico, é possível observar que diversos metabólitos são formados. Teoricamente, todos estes metabólitos poderiam ser quantificados em matrizes biológicas de tecidos inflamados, entretanto, deve-se levar em consideração a estabilidade relativa dos mediadores inflamatórios. Este dado é de extrema importância e justifica a

preferência da quantificação de algumas destas espécies nas análises de quantificação.

Os compostos PGI_2 , TXA_2 e o LTA_4 são extremamente lábeis, possuem um tempo de meia vida de poucos minutos, mesmo em condições de homeostase e, quando possível, são rapidamente convertidos a metabólitos mais estáveis: TXA_2 em TXB_2 , LTA_4 em LTB_4 e PGI_2 em 6-ceto- PGF1_α (CHAPPELL et al., 2011; HIKIJI et al., 2008; MADDIPATI; ZHOU, 2011). Em contraste a isto, PGF2_α , PGD_2 e PGE_2 apresentam grande estabilidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*, não necessitando de um segundo metabólito para sua quantificação (HIKIJI et al., 2008; MADDIPATI; ZHOU, 2011).

3.2 MACRÓFAGOS E AS CÉLULAS RAW 264.7

Os macrófagos são as células mais versáteis do organismo humano, elas estão presentes em praticamente todos os eventos celulares, participando desde a manutenção da homeostase, na reparação de tecidos, até a resposta imune contra patógenos (RUAN et al., 2014).

Estas células são derivadas de monócitos circulantes no sangue e são atraídas para o local inflamado por meio de mediadores inflamatórios diversos (histaminas, prostaglandinas, bradicinina, serotonina, leucotrienos). São as primeiras células de defesa a chegarem ao tecido afetado e as responsáveis pela produção de citocinas ($\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6), que além de promover uma ampliação da inflamação sistêmica, também atraem para o local células do sistema imune (leucócitos e linfócitos) (ROSENBLAT et al., 2014). Microscopicamente esta célula apresenta um núcleo caracterizado por invaginações de tamanhos variados e uma zona intensa de condensação de cromatina em sua periferia. O complexo de Golgi é bem desenvolvido e numerosas vesículas estão presentes no citoplasma. Restos de materiais fagocitados geralmente são encontrados nas vesículas lisossômicas, denominadas fagossomos. Além disso, há um grande número de microvilosidades na periferia da célula, que auxiliam na projeção em direção ao material a ser fagocitado (LINDHE et al., 2010).

As células RAW 264.7 são utilizadas frequentemente para estudos de atividade anti-inflamatória. Estas células são uma linhagem de macrófagos de rato, sendo assim, são promotoras da inflamação quando o meio em que estão sendo cultivadas é enriquecido com um indutor de inflamação, como, por exemplo, o LPS (lipopolissacarídeo) (CUETARA et al., 2006; WANG et al., 2012). Esta espécie é uma molécula derivada de membrana de bactérias gram negativas. O LPS é conhecido por seus efeitos tóxicos em infecções e por ser responsável por promover inflamação sistêmica. Ele atua aumentando todos os mediadores inflamatórios já descritos (CRUZ-MACHADO, 2010). Ao observar a inibição ou decréscimo destes mediadores, podemos então constatar atividade anti-inflamatória de um extrato de plantas, por exemplo (CUETARA et al., 2006; WANG et al., 2012).

3.3 CULTIVOS CELULARES

Há indícios de que a prática do cultivo celular se iniciou no começo do século 20. Harrison, em 1907 na tentativa de provar que as fibras nervosas seriam originadas de células nervosas, desenvolveu o primeiro método para o cultivo de células em condições *in vitro*. Como resultado observou que as células sobreviveram por aproximadamente uma semana, o que foi um marco para a ciência. Em 1912 Carrel descobriu a necessidade de renovar os nutrientes do meio, o que prolongou a vida destas células. Diversos foram os nomes que contribuíram desde então para que este ramo da ciência evoluísse até os dias de hoje, onde sua importância deixou de restringir ao estudo do comportamento de determinado tecido ou célula *in vitro*. Atualmente, este ramo tem ajudado muito a medicina na área terapêutica por intermédio de células tronco e a desvendar algumas doenças degenerativas (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Visto o crescente aumento nos comitês de ética e movimentos em defesa dos direitos dos animais, com o uso de cultivos celulares, além de gastos, podemos diminuir consideravelmente o uso de animais em experiências científicas além de poder investigar o metabolismo celular com poucas variáveis e sem interferentes

fisiológicos. (ALVES; GUIMARÃES, 2010; FRESHNEY, 2000; ROGUET; SCHAEFER, 1997).

3.3.1 Tipos de culturas

Basicamente existem três tipos de células para cultivo celular, as células primárias, as células estabelecidas e as células transformadas (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

As células primárias dão origem a uma cultura primária, que é caracterizada por possuir células retiradas a partir de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática, células estas que mantêm as características do tecido de origem, podendo sobreviver por um período de tempo específico. Este fato é devido a natural programação celular de apoptose, onde uma autodigestão da célula programada se inicia em determinado estado de vida celular (ALVES; GUIMARÃES, 2010; PEREIRA-SMITH, 1988).

Após sucessivos repiques oriundos de culturas primárias, células com maior capacidade de proliferação se destacam em detrimento das primárias, estas células chamadas de linhagem celular contínua, ainda possuem as características do tecido que o originou e são muito utilizadas em pesquisa pela sua grande capacidade de manter-se em cultura por um espaço de tempo relativamente grande (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Ao modificarmos as características gênicas por meio de vírus, substâncias químicas e, ou agentes físicos, as células não mais possuem as características do tecido de origem e desta forma, são chamadas de células transformadas. Estas células, no entanto, podem ser obtidas também por meio de tecidos que já sofreram mutação, como, por exemplo, tecidos tumorais (ALVES; GUIMARÃES, 2010). A modificação genética leva a uma proliferação exacerbada, e a uma falta: na dependência de ancoragem, e na inibição por contato. Estas modificações são causadas principalmente pela mutação da telomerase, enzima esta que repõe o telômero das células, o qual é o responsável pela regulação da divisão celular (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Referente à metodologia de cultivo temos dois tipos: o cultivo de células aderentes e o cultivo de células não aderentes. A escolha do método não se baseia na finalidade ou no rumo que o estudo deve tomar e é dependente das características do tipo celular escolhido para ser a fonte do estudo. Em um cultivo de células aderentes, as células se ligam na superfície da garrafa de cultura, enquanto que nas células não aderentes, as células permanecem em suspensão no meio de cultura (ALVES;GUIMARÃES, 2010;PERES; CURI, 2005).

É lógico pensarmos que células epiteliais crescem com uma maior interdependência célula-célula, então, estas células tendem a formar um cultivo de células aderente. Para que estas células iniciem o processo de divisão, necessitam, primeiramente, de uma ancoragem. Desta forma, devemos induzir a produção de proteínas de adesão, a qual é mediada pela indução de cargas negativas na superfície da garrafa de cultura. As células após se aderirem, começam sua multiplicação, desenvolvem adesão célula-célula e formam o que é chamado de monocamada celular (ALVES;GUIMARÃES, 2010).

Em contrapartida, células hematopoiéticas devem se desenvolver em uma cultura de células não aderentes, não necessitando de uma ancoragem. Células tumorais e de linhagens transformadas também seguem esta lógica (ALVES;GUIMARÃES, 2010).

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DE MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO DO TIPO EICOSANÓIDE

Metodologias de identificação e quantificação de mediadores da inflamação do tipo eicosanóide, já são descritos na literatura desde o final da década de 50 (HAMILTON; KAROL, 1982). Técnicas como cromatografia em coluna aberta, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultra-violeta (CLAE-UV) ou por fluorescência (CLAE-FW), cromatografia gasosa (CG), eletroforese capilar, análises imunoenzimáticas e radioimunoensaios, foram no passado avaliadas por diversos autores (BLEWETT et al., 2008; MASOODI; NICOLAOU, 2006).

Todas essas técnicas, no entanto, possuem desvantagens. As análises de imunoensaios foram consideradas, por muito tempo, as técnicas de escolha para a análise de eicosanóides, esta técnica carece especificidade e reprodutibilidade (PUPPOLO; VARMA; JANSEN, 2014; TSIKAS; ZOERNER, 2014). Detecções por UV, por exemplo, necessitam de um cromóforo. A maioria destas moléculas lipídicas, não são bons cromóforos, pois absorvem em baixos comprimentos de onda e tornam a análise inespecífica (MASOODI; NICOLAOU, 2006). Os detectores a base de fluorescência, em contrapartida, necessitam que o composto seja derivatizado a um complexo que absorva fluorescência (BLEWETT et al., 2008; PUPPOLO et al., 2014). As análises em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas sequencial (CG-EM/EM) necessitam que a amostra passe por etapas de purificação e derivatização, devido ao fato de alguns eicosanóides apresentarem a propriedade de serem termolábeis (MARTIN-VENEGAS; JAUREGUI; MORENO, 2014; TSIKAS; ZOERNER, 2014). Estas etapas tornam a análise complexa, cara e demorada. Além de aumentar a possibilidade de introduzir erros na análise (BLEWETT et al., 2008). Desta forma, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial é a técnica indicada para a análise destes compostos, por permitir, além da quantificação de concentrações baixíssimas em matrizes complexas, uma melhor separação de isômeros (PUPPOLO et al., 2014).

Para que eicosanóides advindos de uma matriz biológica, sejam analisados é necessário que haja uma extração e posterior purificação do analito em questão. Esta etapa melhora a especificidade e sensibilidade e é de extrema importância no caso de matrizes que apresentem concentrações baixíssimas de mediadores inflamatórios do tipo eicosanóide. Esta extração pode ser de dois tipos: uma extração em fase sólida, ou uma extração do tipo líquido-líquido. Para a escolha devemos sempre levar em conta o método que for mais rápido, tiver o melhor custo benefício e melhor reprodutibilidade (PUPPOLO et al., 2014). As extrações do tipo líquido-líquido se baseiam na partição da amostra em duas fases imiscíveis (uma orgânica e outra aquosa). Esta partição se dará pela afinidade do soluto pelo solvente extrator e pode ser ajustado pelo aumento ou diminuição do pH e ou pela adição de sais neutros responsáveis pelo fenômeno de *salting-in* (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Caso os compostos de interesse estejam na fase

aquosa, eles podem ser analisados diretamente por CLAE. Entretanto, se estiverem na fase orgânica, podem ser submetidos à evaporação do solvente para posteriormente serem reconstituídos (WAL et al., 2010). No caso da extração de eicosanóides, o solvente hidrofílico carregará todas as impurezas de natureza hidrofílica, e o de natureza hidrofóbica, atrairá os eicosanóides para si (PUPPOLO et al., 2014).

A vantagem deste método é a sua simplicidade, rapidez e capacidade de recuperação (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009; WAL et al., 2010). Como desvantagem é possível a formação de emulsões que dificultam a extração, o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos, que podem ser tóxicos e prejudiciais ao ambiente (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

Na extração em fase sólida (EFS), utilizam-se cartuchos que se assemelham a colunas cromatográficas, diferindo somente no empacotamento do seu recheio, que pode ser de três formas: fase normal, fase reversa, e de troca iônica. Na fase reversa, a qual é geralmente utilizada para a separação de eicosanóides, temos um recheio composto por C18. A amostra, após ter sido centrifugada, passa pelo cartucho de EFS, em que a parte lipídica dos compostos interage com as cadeias alifáticas do cartucho, ficando retidas nele e separando assim as impurezas da amostra. Por fim lava-se o cartucho com um solvente apolar, que carrega os compostos para si, deixando-os puros e isolados (PUPPOLO et al., 2014).

Esta técnica necessita de pouco solvente orgânico comparado com a extração líquido-líquido e evita a formação de emulsões (KATAOKA, 2003; BLAHOVÁ; BRANDSTETEROVÁ, 2004). No entanto, quando comparada a uma extração líquido-líquido, pode ser considerada tediosa e requer maior habilidade por parte do analista (MESAROS, 2009), devido ao cuidado necessário com a velocidade de eluição da amostra. Além disso é considerada ainda uma técnica dispendiosa devido a instrumentação necessária para o procedimento (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

Quando analisados por CLAE-EM/EM, os eicosanóides frequentemente formam moléculas protonadas ou desprotonadas. O uso de ionização por *eletrospray* (ESI) permite análises sem a necessidade de derivatização, e ou demoradas preparações de amostra, além de ser versátil, sensível e seletivo. A ESI é muito aplicada nestas análises em função de ser uma técnica que pode dispensar o aquecimento, além de resultar em abundantes íons $[M-H]^+$, advindas dos grupos de

ácido carboxílico livres, o que permite detecções mesmo em baixas concentrações(MARTIN-VENEGAS et al., 2014; MASOODI; NICOLAOU, 2006; PUPPOLO et al., 2014).

3.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento do cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (VÉKEY, 2001).

Devido a sua alta sensibilidade e seletividade, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM), é uma poderosa técnica analítica para quantificação de um grande número de metabólitos com características estruturais muito próximas em diferentes matrizes.

No sistema CLAE-EM/EM após a passagem da amostra pelo cromatógrafo, ela segue para o espectrômetro de massas, que é formado por quatro componentes principais: a fonte de ionização, o analisador de massas, o detector e um sistema de tratamento de dados (ZHOU; LIOTTA; PETRICON, 2013).

3.6.1.1 Fontes de ionização

A ionização do analito em questão é o ponto crucial da análise por espectrometria de massas. O objetivo desta etapa é transformar as espécies neutras em espécies iônicas em fase gasosa, através da adição ou remoção de partículas carregadas (elétrons, prótons ou íons de outros elementos) (NIESSEN, 2003).

Tal etapa é de extrema importância pela natureza analítica deste método. As análises em espectrometria de massas, como já dito, são feitas baseadas em partículas carregadas, positivamente ou negativamente, devido a facilidade em manipular o movimento e a direção destas, pela geração de campos elétricos ou magnéticos (DASS, 2007).

Muitos mecanismos de ionização são descritos na literatura, cada um com suas peculiaridades singulares. A escolha do método, entretanto, é baseada na natureza do composto analisado e do tipo de informação desejada.

O desenvolvimento da ionização por *eletrospray* revolucionou a análise de biomoléculas por meio da espectrometria de massas (DASS, 2007). Esta técnica, juntamente com a MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), são os dois métodos de ionização mais utilizados em amostras biológicas (ZHOU et al., 2013).

Na ESI, ocorre a geração de um fino spray de gotículas carregadas, sobre a influência de um intenso campo elétrico. A ionização ocorre em função de uma alta voltagem (3 a 4 kV), aplicada na ponta de um fino capilar de aço inoxidável por onde emerge a amostra contendo os analitos de interesse, dissolvidos num solvente líquido volátil. A diferença de potencial entre a ponta do capilar e o eletrodo, produz um campo eletrostático, que é suficientemente forte para dispersar a solução emergente em uma fina névoa de gotículas carregadas, em que a carga líquida do aerossol se torna positiva ou negativa, dependendo da polaridade da voltagem aplicada. A evaporação destas gotículas é geralmente assistida por um fluxo de nitrogênio (150-200 °C). Com a diminuição da gotícula e a aproximação das cargas, a alta repulsão eletrostática supera as forças de tensão superficial e ocorre então o fenômeno da “Explosão Coulombica”, onde os analitos em forma iônica são então liberados para atravessar o analisador de massas (GLISH; VACHET, 2003).

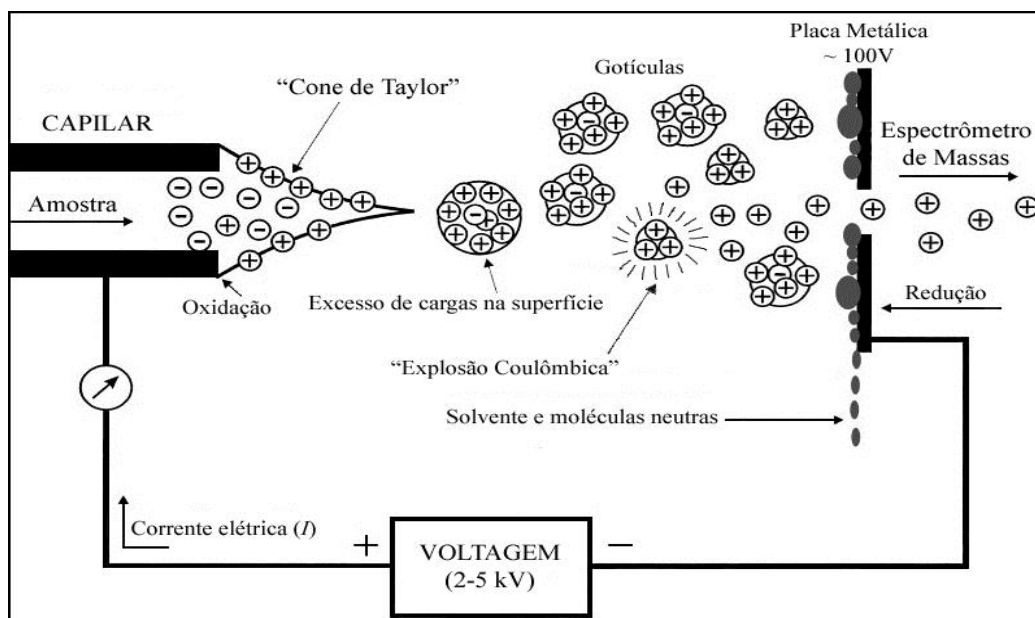


FIGURA 8 - ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DA IONIZAÇÃO POR *Eletrospray* (ESI)

FONTE: adaptado de (CECH; ENKE, 2001)

Outra técnica amplamente utilizada é a ionização química à pressão atmosférica (APCI). Nesta técnica, o eluente que saiu da coluna cromatográfica passa através de um nebulizador pneumático, o qual é responsável pela geração de um spray. Este spray passa por uma região aquecida e é seco, formando espécies neutras que sofrem ação de uma descarga corona (CHIARADIA et al., 2008).

A APCI pode ser considerada uma técnica complementar à ESI, isto porque é útil na análise de compostos que varia de apolares a média polaridade, que sejam voláteis e termicamente estáveis, e pelo fato de suportar fluxos cromatográficos maiores ($0,5$ a $2,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), enquanto que na ESI podemos utilizar fluxos de até $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (CHIARADIA et al., 2008).

Em ambas estas duas técnicas temos uma ionização dita como “suave”. Isto se deve a energia empregada, que não é suficiente para gerar uma fragmentação significativa das moléculas do analito e levando então a formação de íons pseudo-moleculares intactos $[M+H]^+$ no modo positivo ou $[M-H]^-$ no modo negativo (CHIARADIA et al., 2008).

3.6.1.2 Analisadores de massas

Os analisadores de massa são os módulos responsáveis pelo controle da trajetória dos íons formados pela fonte de ionização. Através de campos elétricos e magnéticos, ocorre a separação entre os íons, segundo os valores de m/z , que são então encaminhados para o detector. Diversos mecanismos são utilizados para a análise das massas, entre eles os analisadores de setor, por armadilha de íons, por tempo de voo, com transformada de Fourier, por mobilidade de íons e os quadrupolares (DE SOUZA, 2008). O Quadro 2 mostra as diferentes metodologias empregadas pelos analisadores de massas mais comuns.

TIPO DE ANALISADOR DE MASSAS	MECANISMO DE SEPARAÇÃO DA m/z
Analisadores de setor	Utiliza campos elétricos e magnéticos em forma circular para afetar a trajetória e a velocidade dos íons até a sua chegada ao detector. Dessa forma, a separação ocorre em função da maior ou menor trajetória percorrida pelos íons em função da relação m/z (quanto maior a m/z , maior a trajetória percorrida).
Analisadores por armadilha de íons	O analito é aprisionado em um ambiente cercado por eletrodos, que cria um campo elétrico que mantém os íons em uma órbita estável em seu interior. Em função da aplicação de voltagem por radiofrequência, os íons são desestabilizados e ejetados para fora do analisador, de uma forma crescente de acordo com seus valores de m/z .
Analisadores por mobilidade de íons	Possuem um ambiente denominado “câmara de deslizamento”, na qual existe um campo elétrico uniforme (que impulsiona os íons até o detector) e um gás como o argônio (que oferece resistência para o deslocamento dos íons). Dessa forma, íons mais volumosos percorrem a câmara e atingem o detector mais lentamente, quando comparados com íons mais compactos
Analisadores quadrupolares	Utilizam campos elétricos oscilantes (gerados por corrente-direta ou por radiofrequência), que aplicados em quatro barras metálicas dispostas como nos vértices de um quadrado, estabilizam ou desestabilizam seletivamente íons com determinadas m/z durante sua passagem pelo centro do quadrupolo. Dessa forma, o quadrupolo atua como um filtro, permitindo a chegada ao detector somente de íons que conseguiram atravessar o campo elétrico, e ainda assim, cada qual em um tempo diferente.
Analisadores por tempo de voo	Baseiam-se no princípio de que íons de mesma carga possuem velocidades iguais se acelerados em um campo elétrico com potencial constante, e então a sua velocidade dentro do analisador será proporcional apenas a sua massa. Dessa forma, íons de menor m/z , ou seja, com massas menores, atingirão o detector antes dos íons de massa maior

QUADRO 2 – MECANISMOS DE SEPARAÇÃO DE ÍONS PELOS ANALISADORES DE MASSAS MAIS COMUNS USADOS EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS (continua)

Analísadores por transformada de Fourier	Aprisionam íons em órbitas através de campos magnéticos e elétricos estáticos, e pulsos característicos de voltagem por radiofreqüência excitam íons de acordo com suas m/z , que então mudam de órbita e conseguem atingir o detector.
--	---

QUADRO 2 – MECANISMOS DE SEPARAÇÃO DE ÍONS PELOS ANALISADORES DE MASSAS MAIS COMUNS USADOS EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS (conclusão)

FONTE: adaptado de De souza (2008)

Os sistemas quadrupolares de análise de massas, utilizando analisadores do tipo triplo-quadrupolo são os mais utilizados (NIESSEN, 2003).

Este instrumento é composto por três quadrupolos em série. O primeiro têm a função de filtrar e isolar os íons de acordo com sua m/z . No segundo quadrupolo (célula de colisão) temos a fragmentação dos íons por meio de dissociação induzida por colisão com um gás inerte e posterior direcionamento ao terceiro quadrupolo. Quando esta colisão é realizada com baixa energia temos normalmente a formação de fragmentos neutros, que podem ser importantes na determinação estrutural, pois fornecem informações sobre grupos funcionais presentes na molécula(CHIARADIA et al., 2008).

Ao se utilizar uma alta energia de colisão, geralmente ocorre a quebra da molécula em regiões específicas, nos dando informações estruturais mais significativas. Esta energia deve ser cuidadosamente escolhida, pois energias muito altas podem levar a fragmentações descontroladas(CHIARADIA et al., 2008).

3.6.1.3 Detectores

Os detectores compreendem a porção final dos espectrômetros de massas, e sua função é detectar os íons que chegam até eles e amplificar o sinal. Para isto converte os feixes de íons em um sinal elétrico, que pode ser amplificado, armazenado, e exibido de forma que possa ser facilmente entendido. Dentre as principais características que um detector deve ter podemos citar; sensibilidade, precisão, resolução, tempo de resposta, estabilidade, ampla faixa dinâmica, e baixo nível de ruído (DASS, 2007).

O Quadro 3 mostra diferentes metodologias empregadas pelos detectores de massas.

TIPO DE DETECTOR DE MASSAS	MECANISMO
Detector copo de Faraday	Se baseia na detecção de íons por meio de um eletrodo coletor conectado a um amplificador de alta impedância por meio de uma resistência de retroalimentação. O feixe de íons incidente transfere sua carga no momento de incidência com o eletrodo.
Multiplicadores de elétrons	Consiste de um conjunto de dinodos à base de Cu-Be polarizados com alta tensão. Quando um íon colide com alta velocidade sobre o primeiro dinodo arranca uma certa quantidade de elétrons. Estes elétrons, quando incidem sobre o segundo dinodo, aumentam em X2 e estes X2 elétrons, quando incidem na terceira célula, aumentam em X3. A quantidade final de elétrons amplificados se dá na forma de progressão geométrica.
Detector por fotomultiplicador	De construção similar ao multiplicador de elétrons, se baseia na conversão do feixe de íons em feixe de fótons por meio de um material cintilante presente nos dinodos.
Detectores de pós-aceleração	Estes detectores têm dois dinodos de conversão, um para íons positivos e outro para íons negativos um material cintilante (fósforo) e um fotomultiplicador. Os elétrons secundários emitidos são acelerados na direção do material cintilante. Os fótons liberados do fósforo são transmitidos para o fotomultiplicador para posterior detecção.
Detectores criogênicos	Baseiam-se no princípio da transformação de energia cinética dos íons, em calor. A resposta da calorimetria destes tipos de detectores é 100% eficiente e independente da massa, não tendo limite superior para detecção.
Detectores do tipo placas multicanaís (MCP)	São placas contendo milhares de pequenos canais com efeito amplificador semelhante a de Multiplicadora de Elétrons. Muito utilizados em espectrômetros de massas com analisadores do tipo tempo de voo (TOF). Apresentam altíssima sensibilidade, alta velocidade de aquisição e baixo ruído eletrônico, porém saturam-se facilmente e apresentam baixa sensibilidade.

QUADRO 3 – MECANISMOS DE DETECÇÃO DE ÍONS PELOS DETECTORES DE MASSAS USADOS EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

FONTE: adaptado de Dass (2007)

Dentre os vários tipos de detectores existentes, destaca-se o multiplicador de elétrons, utilizado em diferentes tipos de espectrômetros de massas. Sua habilidade em amplificar pequenas correntes iônicas em correntes ou pulsos elétricos facilmente mensuráveis faz desta técnica uma sensível ferramenta para a quantificação de analitos. O princípio de funcionamento de um multiplicador de elétrons baseia-se na emissão secundária de elétrons, onde uma partícula

carregada (proveniente do analisador de massas) atinge uma superfície denominada dinodo, causando a liberação de elétrons dos átomos que a constituem, geralmente cobre ou berílio. Dessa forma, os dinodos atuam refletindo as partículas que se chocam a eles, atuando na amplificação do sinal inicial, que pode chegar à ordem de 10^7 a 10^8 (RICHTER *et al.*, 2001).

A Figura 9 mostra o esquema de funcionamento de um detector do tipo multiplicador de elétrons.

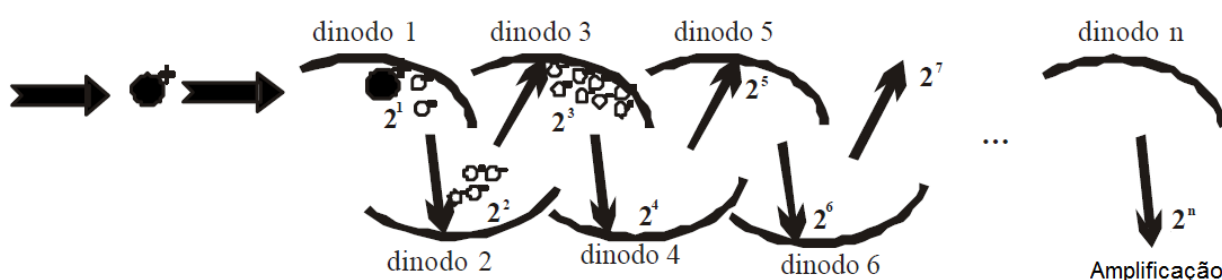


FIGURA 9 – ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DE UM DETECTOR DE MASSAS DO TIPO MULTIPLICADOR DE ELÉTRONS

FONTE: adaptado de Sato; Kawashita (2002)

3.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

A validação de um método é um aspecto crucial da garantia da qualidade analítica, e assim tem recebido uma atenção considerável por parte da comunidade científica, comitês industriais e entidades reguladoras (SILVA; ALVES, 2006). Cada método, seja ele analítico ou bioanalítico, tem sua particularidade e está sujeito a variações. Logo, para que a correta interpretação dos seus resultados seja alcançada, é primordial garantir a qualidade nas análises de modo que esses métodos sejam reproduzíveis e confiáveis (RIBANI *et al.*, 2004; SHAH, 2007).

Para tal finalidade, utiliza-se da ferramenta de validação. Que tem por objetivo, garantir por meio de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando dessa forma a credibilidade dos resultados. Para tanto, quando do desenvolvimento de um novo método ou de

mudanças na síntese da substância ativa e/ou na composição do produto acabado, faz-se necessária a análise de uma série de parâmetros que garantam que o método de análise seja confiável (BRASIL, 2012).

Desse modo, a Agência nacional de vigilância sanitária do Brasil (ANVISA), pela resolução RDC n. 27, de 17 de maio de 2012, exige alguns parâmetros a serem analisados: Limites de detecção e quantificação, linearidade, seletividade, efeito residual, efeito matriz, precisão, exatidão e estabilidade dos analitos em matriz e em solução (BRASIL, 2012).

3.7.1 Seletividade

É a habilidade de um método analítico de diferenciar e quantificar os compostos em estudo de outros componentes que possam estar presentes na matriz biológica, ou seja: medir exatamente um composto específico na amostra, independente da presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e demais elementos da matriz. Em métodos instrumentais de separação a seletividade é a garantia de que os resultados obtidos não sejam prejudicados pela presença de interferentes da amostra (BRASIL, 2012). Dessa forma, a seletividade garante que o pico da resposta seja exclusivamente do composto de interesse e deve ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental (RIBANI *et al.*, 2004).

3.7.2 Linearidade

A linearidade é definida como a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (FDA, 2013). A validação quanto a este parâmetro deve garantir um máximo de precisão e exatidão nos resultados, parâmetros esses monitorados através das amostras de controle de qualidade (CQ).

As CQ estão descritas a seguir, e nada mais são do que amostras de matriz adicionada do analito em concentração específica, utilizadas para validar e monitorar o desempenho de um método bioanalítico (BRASIL, 2012).

- Amostra de controle de qualidade de baixa concentração (CQB): amostra de matriz adicionada do analito em concentração até três vezes o limite inferior de quantificação do método;
- Amostra de controle de qualidade de média concentração (CQM): amostra de matriz adicionada do analito em concentração próxima à média entre o limite inferior e superior de quantificação do método para cada analito;
- Amostra de controle de qualidade de alta concentração (CQA): amostra de matriz adicionada do analito em concentração entre 75 e 85% da maior concentração da curva de calibração;
- Amostra de controle de qualidade de diluição (CQD): amostra de matriz adicionada do analito em concentração acima da maior concentração da curva de calibração, analisada por meio de procedimento e proporção de diluição especificada pelo laboratório analítico (BRASIL, 2012);

3.7.3 Precisão

A precisão representa a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz (BRASIL, 2012).

Dessa forma, o procedimento analítico é aplicado várias vezes sob condições idênticas de ensaio numa amostra homogênea, e a precisão é então expressa em função da dispersão dos resultados, através do coeficiente de variação (CV%), entre as determinações. A precisão é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRASIL, 2012; SILVA; ALVES, 2006).

A repetibilidade, também chamada de precisão intra-corrida, representa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação. Deve ser realizado no mínimo cinco

replicatas, em pelo menos cinco concentrações diferentes (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) (BRASIL, 2012).

A precisão intermediária, ou precisão inter-corridas, revela a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, porém obtidos em dias diferentes e com analistas e/ou equipamentos diferentes, avaliando-se portanto os efeitos aleatórios do procedimento analítico. Ela representa com mais confiabilidade a variabilidade dos resultados em um laboratório (BRASIL, 2012; RIBANI *et al.*, 2004).

3.7.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação a um valor de referência. Similar ao ensaio de precisão, a exatidão deve ser avaliada em dois níveis: intracorrida e intercorrida. A exatidão é expressada pelo Erro Padrão Relativo (EPR), apresentada em porcentagem.

3.7.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção representa a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2012). Ele é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível, que pode ser confiavelmente detectável, através da diferenciação do ruído de fundo. Na prática, no caso dos métodos instrumentais como CLAE e CG, o limite de detecção pode ser estimado com base na relação sinal-ruído, onde o sinal do analito deve ser pelo menos três vezes o ruído da linha de base (BRASIL, 2012; RIBANI *et al.*, 2004).

3.7.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Este parâmetro, também pode ser determinado através da análise de soluções de concentração conhecida sucessivamente diluídas, por meio da relação sinal-ruído gerado. Desta forma, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10 vezes a altura do ruído da linha de base (BRASIL, 2012).

3.7.7 Estabilidade

A estabilidade é um parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo. As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Dessa forma, este estudo deve ser realizado durante a coleta e sob armazenamento de curta e longa duração das amostras. A instabilidade das drogas, seus metabólitos ou ainda das pró-drogas é um dos principais problemas relativos às amostras biológicas, e por isso, monitorar o comportamento da substância de interesse tanto em solução quanto na matriz biológica é de fundamental importância para evitar a subestimação ou a superestimação da sua concentração (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Os problemas de estabilidade em geral se relacionam com as condições de armazenamento, presença de enzimas, pH, anticoagulante, ciclos de descongelamento, luz, e pelas propriedades químicas do analito, da matriz e do recipiente de armazenamento (BRASIL, 2003; FDA, 2013; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Dessa forma, o ensaio de estabilidade deve reproduzir as reais condições de

manuseio e análise das amostras, e não pode ser extrapolado se houver qualquer mudança na conduta de um ensaio bioanalítico (BRASIL, 2003, 2012).

3.7.9 Efeito matriz

O efeito matriz é o efeito na resposta do analito ou padrão interno causado pela co-eluição de componentes residuais da matriz, que afetam a eficiência da ionização ou detecção das moléculas alvo (supressão ou elevação de sinal). (PATEL, 2011; BRASIL, 2012). Este efeito ocorre com mais frequência quando a ionização é por *eletrospray* (YADAV *et al.*, 2009). Avaliar esse parâmetro é de suma importância para evitar a expressão de falsos resultados (BRASIL, 2012; PATEL, 2011).

3.7.10 Efeito residual

Gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou padrão interno causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente (BRASIL, 2012). Trata-se então, de um ensaio que visa garantir que a amostra anterior não interfira na amostra seguinte em função de contaminações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE EICOSANÓIDES DO MEIO DE CULTIVO CELULAR

Diferentes experimentos foram realizados no sentido de se obter o maior rendimento possível de recuperação dos analitos do meio de cultivo celular. A análise da literatura mostrou uma grande variedade de técnicas, envolvendo principalmente extração por partição líquido-líquido e extração por fase sólida utilizando cartuchos de sílica C-18, sílica híbrida ou similar (BLEWETT *et al.*, 2008; HISHINUMA *et al.*, 2007; NITHIPATIKOM *et al.*, 2003; SCHMIDT; COSTE; GEISSLINGER, 2005).

Para o método de extração líquido-líquido, diversas condições foram testadas (quadro 4) a fim de se obter a máxima eficiência de extração para todos os compostos analisados. Inicialmente foram definidos os melhores líquidos extratores, para posteriormente determinar a melhor condição de extração. Por último ajustes nos tempos de centrifugação e quantidade recuperada foram definidos a fim de se obter a melhor condição de extração.

Para o cálculo da porcentagem de recuperação, uma solução padrão dos analitos a 10 ng.mL^{-1} diluído em fase móvel foi preparado no momento do uso, e a área relativa a este padrão (considerada 100%) foi comparada com a área do analito recuperado na amostra, segundo a Equação (1).

$$R(\%) = \frac{\text{Área do pico na amostra}}{\text{Área do pico na solução padrão}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Os testes foram realizados em triplicata, os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação e a condição escolhida com base no maior sinal/ruído e recuperação obtidos. No Quadro 4 encontram-se as condições empregadas no

desenvolvimento do método de extração de PGE_2 , PGD_2 , 6-CETO-PGF $_{1\alpha}$, PGF $_{2\alpha}$, e TXB $_2$ em meio de cultivo celular, utilizando extração líquido-líquido.

TÉCNICA	SOLVENTE UTILIZADO	QUANTIDADE DE LÍQUIDO EXTRATOR	NÚMERO DE EXTRAÇÕES	VOLUME DE SOLVENTE RECUPERADO
1	Hexano	1 mL	1 de 1 mL	900 μL
2	Acetato de etila	1 mL	1 de 1 mL	900 μL
3	Hexano/Acetato de etila 50:50	1 mL	1 de 1 mL	900 μL
4	Hexano/Acetato de etila 80:20	1 mL	1 de 1 mL	900 μL
5	Hexano/Acetato de etila 20:80	1 mL	1 de 1 mL	900 μL
6	Clorofórmio	1 mL	1 de 1 mL	900 μL
7	Éter metil terciário butílico	1 mL	1 de 1 mL	900 μL
8	Éter dietílico	1 mL	1 de 1 mL	900 μL
9	Diclorometano	1 mL	1 de 1 mL	900 μL
10	Acetato de etila	2 mL	2 de 1 mL	1800 μL
11	Hexano/Acetato de etila 50:50	2 mL	2 de 1 mL	1800 μL
12	Hexano + Acetato de etila	1 mL + 1 mL	2 de 1 mL	1800 μL
13	Acetato de etila	1.5 mL	3 de 500 μL	1200 μL
14	Acetato de etila	2 mL	2 de 500 μL e 1 de 1 mL	1700 μL
15	Acetato de etila	1 mL	1 de 1 mL	800 μL
16	Acetato de etila	1 mL	1 de 1 mL	700 μL

QUADRO 4 – CONDIÇÕES EMPREGADAS NOS TESTES DE RECUPERAÇÃO DE PGE_2 , PGD_2 , 6-CETO-PGF $_{1\alpha}$, PGF $_{2\alpha}$ E TXB $_2$ EM MEIO DE CULTIVO CELULAR, UTILIZANDO EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.

FONTE: O autor (2016)

4.2 EXTRAÇÃO DOS EICOSANÓIDES DO CULTIVO CELULAR

Num primeiro momento, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf®, Centrifuge 5810R) por 5 minutos a 14000 rpm para remover restos celulares (DEEMS *et al.*, 2007). Retirado o sobrenadante, a extração foi conduzida da seguinte forma:

O sobrenadante do cultivo celular obtido após o tratamento das células foi submetido a um processo de extração para a quantificação dos eicosanóides. Em um tubo de polipropileno de 2 mL, 900 µL de sobrenadante foram adicionados de 50 µL de padrões internos, correspondendo a 5 ng, e 50 µL de ácido fórmico para garantir que as moléculas de interesse se encontrem em sua forma não ionizada. Após esta etapa é agitada em vórtex a 3200 rpm (Scientific industries, inc[®], vortex-genie 2) e finalmente a amostra foi submetida ao processo de extração líquido-líquido.

4.2.1 Extração líquido-líquido

Ao sobrenadante, obtido conforme descrito em 4.2, em tubo de polipropileno, foi adicionado 1 mL de solvente acetato de etila e então agitados por 5 minutos em vórtex a 3200 rpm, seguida de 10 minutos de centrifugação a 14000 rpm (Eppendorf[®], Centrifuge 5810R). O sobrenadante, 700 µL da fase orgânica, recuperado em tubos de polipropileno de 2 mL, foi evaporado em fluxo de nitrogênio. Após total evaporação, o resíduo foi ressuspendido com 100 µL de fase móvel, agitado em vórtex por 30 segundos e mantido em banho de ultra-som por 30 segundos, seguida de centrifugação (14000 rpm 0° C por 1 minuto). Finalmente, transferiu-se 70 µL do sobrenadante para insertos em *vials* âmbar, para posterior análise por CLAE-EM/EM.

4.2.2 Extração em fase sólida

Ao sobrenadante, obtido conforme descrito na seção 4.2, em tubo de polipropileno, foi conduzido o método de extração em fase sólida, utilizando cartuchos de extração em fase sólida (HLB OasisTMWaters[®], 30 µm de poro, 30 mg de fase estacionária copolimérica, capacidade de 1 mL), através do auxílio de

sistema *Manifold* (Waters®, Milford-Massachusetts, USA). Método este desenvolvido por Martins (2013). Dessa forma, aliquotou-se 900 µL do meio de cultivo DMEM (suplementado com 0,1% de SFB, isento de vermelho de fenol) previamente centrifugado por 5 minutos a 7000 rpm a -9°C (Eppendorf®, Centrifuge 5810R). Este foi fortificado com 50 µL de solução-padrão dos analitos a 200 ng.mL⁻¹, e em seguida submetido a extração em fase sólida da seguinte forma: primeiramente o pré-acondicionamento da coluna de EFS (Oasis HLB™) foi realizado com 2 mL de metanol e 2 ml de ácido fórmico 0,1%. Após a passagem da amostra, o cartucho foi lavado com 2 ml de ácido fórmico 0,1%. Então, o cartucho foi eluído com 1 ml de acetato de etila e 1 mL de hexano, sendo estas frações recuperadas (tubos de polipropileno de 2 mL) e então evaporadas através de fluxo de nitrogênio. Em seguida, o resíduo foi reconstituído com 100 µl de fase móvel, agitado em vórtex durante 1 minuto e mantido em banho de ultra-som por 30 segundos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm (-9°C) por 5 minutos, e então 70 µL do sobrenadante foram transferidos para insertos em *vials* âmbar para a análise por CLAE-EM/EM.

4.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE PGE₂, PGD₂, 6-CETO-PGF_{1α}, PGF_{2α}, E TXB₂ POR CLAE-EM/EM

Um novo método para análise dos metabólitos PGE₂, PGD₂, 6-CETO-PGF_{1α}, PGF_{2α}, e TXB₂ foi desenvolvido, buscando especificidade, qualidade dos picos cromatográficos e rapidez na análise. A análise na literatura atual revelou que o tempo médio para a análise de eicosanóides ficou em torno de 13 minutos. O objetivo foi então reduzir ao máximo o tempo de corrida.

4.3.1 Instrumentação

O cromatógrafo utilizado nas análises foi um modelo Agilent® Technologies 1200 Series, com bomba binária G1312B, desgaseificador G1379B e forno de coluna TCC SL G1316B. O sistema foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo da Applied Biosystems® modelo API 3200, utilizando fonte de ionização do tipo *Eletrospray* (ESI). O injetor automático e gerenciador de amostras utilizado foi o modelo CTC Waters® 2777 Sample Manager, e os dados obtidos pelo CLAE-EM/EM foram processados através do *software* Analyst®, versão 1.4.2.

4.3.2 Preparo de padrões

Os padrões de PGE₂, PGD₂, 6-CETO-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TXB₂ de concentração 200.000 ng.mL⁻¹ (Cayman® Chemical, lote 046633) e PGB₂-d4 de concentração 500.000 ng.mL⁻¹ (Cayman® Chemical, lote 2745-5) ambos diluídos em acetato de metila foram mantidos em suas embalagens de origem sob refrigeração a -40°C até o momento do uso.

Foi preparada uma solução-estoque por diluição com metanol (Tedia® Brazil), de forma a obter uma solução de 1000 ng.mL⁻¹ de cada um dos analitos (PGE₂, PGD₂, 6-CETO-PGF_{1α}, PGF_{2α}, e TXB₂), e também uma solução-estoque de PGB₂-d4, de concentração 200 ng.mL⁻¹, por diluição em metanol (Tedia® Brazil). Estas soluções foram armazenadas em refrigerador a -40°C. As soluções de trabalho foram preparadas diluindo a solução-estoque em diluente adequado de acordo com a necessidade de cada experimento.

Durante todo o processo de preparo das soluções, evitou-se a incidência direta de luz sobre as amostras, trabalhando-se em ambiente com pouca luminosidade. Além disso, o tempo de exposição das soluções a temperatura ambiente foi sempre o menor possível, para evitar degradações.

4.3.3 Desenvolvimento do método por CLAE-EM/EM

4.3.3.1 Infusão direta no Espectrômetro de Massas (EM)

A checagem do sinal dos analitos foi realizada através da técnica da infusão direta. Este passo foi necessário para a avaliação da intensidade da ionização sofrida pelos analitos na solução. Dessa forma, uma solução contendo a mistura dos padrões de PGE₂, PGD₂, 6-CETO-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TXB₂ e PGB₂-d4 foi elaborada a uma concentração de 250 ng.mL⁻¹ de cada composto, diluídos em acetonitrila/água (50:50 v/v). Esta concentração foi suficiente para obter-se uma intensidade de sinal com valores próximos entre 2×10^5 e 1×10^6 cps, preconizada pelo fabricante do equipamento como sendo suficiente para que seja possível a posterior otimização automática dos parâmetros de detecção.

Para este experimento, a posição do capilar vertical do ESI foi mantido em 10 mm e do horizontal em 5 mm. As amostras então foram infundidas no EM utilizando uma seringa (Hamilton®, Reno, NV-USA), mantendo um fluxo de alimentação de 10 µL/min. O monitoramento dos dois analitos foi realizado no modo negativo, em função das suas características de ionização.

4.3.3.2 Otimização automática do equipamento por *MRM*

Uma vez que a concentração utilizada para os analitos se adequou às características do equipamento, foi então realizada a otimização automática dos parâmetros de DP (potencial de desagregação), EP (potencial de entrada), CEP (potencial de entrada na célula de colisão), CE (energia de colisão) e CXP (potencial da célula de saída) do analisador de massas do equipamento. Um ajuste fino de cada parâmetro foi realizado automaticamente para cada analito, e ao final deste

procedimento o software utilizado para o processamento de dados forneceu um relatório contendo todos os valores otimizados.

Após a otimização por *MRM* (*Multiple Reaction Monitoring*), foram obtidos os espectros dos íons moleculares $[M-H]^+$ da PGE_2 , PGD_2 , 6-CETO-PGF_{1 α} , PGF_{2 α} , TXB₂ e do padrão interno PGB₂-d4, bem como seus fragmentos (íons-filhos). Foram então escolhidos para o monitoramento no espectrômetro de massas os dois fragmentos mais intensos (estáveis) relativos a cada analito.

4.3.3.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

Após o ajuste dos parâmetros do analisador de massas, foram então otimizados os parâmetros da fonte de ionização. Para isto foi realizada uma Análise por Injeção em Fluxo (FIA), que ajustou CUR (gás de cortina), CAD (gás de colisão), GS1 (gás nebulizador), GS2 (gás secante), IS (voltagem do capilar) e TEM (temperatura da fonte).

A injeção em fluxo foi realizada acoplando-se o cromatógrafo, sem a coluna cromatográfica, ao espectrômetro de massas. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (50:50 v/v), com fluxo de 200 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ e volume de injeção de 10 μL . A posição vertical do capilar do *Eletrospray* foi ajustada para 3 mm, e a horizontal para 5 mm.

4.3.3.4 Análise por CLAE-EM/EM

Para o desenvolvimento do método analítico, foi utilizada como base metodologia descrita por Martins (2013). O método citado foi modificado com a finalidade de otimização do mesmo. Diversas colunas foram testadas (Quadro 5), assim bem como diferentes composições de fase móvel e condições cromatográficas, a fim de se obter o melhor desempenho.

n°	Coluna
1	ZORBAX SB C-18 4,6 x 150 mm 1.8 µm
2	Aquity BEH C-18 2,1 x 100 mm 1.7 µm
3	XBRIDGE C-18 2,1 x 100 mm 5 µm
4	ZORBAX Eclipse XDB C-18 4,6 x 150 mm 3.5 µm
5	ZORBAX Eclipse XDB C-18 2,1 x 50 mm 1.8 µm
6	ZORBAX Eclipse XDB C-18 4,6 x 50 mm 1.8 µm

QUADRO 5 – RELAÇÃO DAS COLUNAS TESTADAS NO DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE EICOSANÓIDES EM MEIO DE CULTIVO DE CÉLULAS RAW 264.7.

Com o desenvolvimento finalizado, a coluna de cromatografia escolhida foi uma ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 x 50 mm) 1.8 µm. A fase móvel utilizada foi água (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 1% de ácido fórmico, a um fluxo de 700 µl.min⁻¹ com tempo de corrida de 4 minutos e meio e gradiente descrito na Tabela 1. O volume de injeção foi de 5 µl e o forno de coluna se manteve em 40 °C. No espectrômetro de massas, o modo de ionização utilizado foi o negativo, com o nitrogênio sendo usado como gás nebulizador. A temperatura do gás foi de 450 °C e a voltagem do capilar do eletrospray foi -4500 V. A solução de limpeza utilizada no injetor automático foi água/acetonitrila (50:50) contendo 0,5 % de ácido fórmico.

TABELA 1 – GRADIENTE CROMATOGRÁFICO UTILIZADO NO MÉTODO FINAL PARA DETECÇÃO E DOSEAMENTO DE EICOSANÓIDES EM MATRIZ DE CÉLULAS RAW 264.7 E MEIO DE CULTIVO DMEM.

	0 min	0,5 min	1,57 min	1,58 min	4 min
A (%)	55	55	25	55	55
B (%)	45	45	75	45	45

Na Tabela 2, encontram-se os valores de transição MRM para cromatografia líquida, acoplada a espectrômetro de massas dos mediadores da inflamação do tipo eicosanóide analisados.

TABELA 2 - TRANSIÇÕES MRM UTILIZADAS NA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS *TANDEM* PARA COMPOSTOS EICOSANÓIDES

EICOSANÓIDE	MRM (<i>m/z</i>)	ENERGIA DE COLISÃO (Volts)	TIPO DE ANÁLISE
PGE ₂	351.1-271.2	-22000	Quantificação
PGD ₂	351.1-271.2	-22000	Quantificação
6-keto-PGF _{1α} (PGI ₂)	369.0-163.2	-34000	Quantificação
TXB ₂	369.0-169.1	-24000	Quantificação
PGF _{2α}	353.1-193.0	-30000	Quantificação
PGB ₂ -d4	337.1-113.1	-34000	Quantificação
PGE ₂	351.1-315.3	-14000	Confirmação
PGD ₂	351.1-315.3	-14000	Confirmação
6-keto-PGF _{1α} (PGI ₂)	369.0-83.0	-30000	Confirmação
TXB ₂	369.0-195.2	-18000	Confirmação
PGF _{2α}	353.1-309	-25000	Confirmação
PGB ₂ -d4	337.1-179.4	-30000	Confirmação

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

A validação do método bioanalítico seguiu os critérios estabelecidos pela resolução ANVISA RDC n. 27, de 17 de maio de 2012. De acordo com esta resolução os seguintes parâmetros foram avaliados: limites de detecção e quantificação, exatidão, seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão e estabilidade dos analitos em matriz biológica e em solução (BRASIL, 2012).

4.4.1 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite inferior de quantificação (LIQ) foram estimados através da relação sinal-ruído. Para condução deste estudo, soluções de

trabalho a partir de uma solução mãe (contendo PGE_2 , PGD_2 , 6-CETO-PGF $_{1\alpha}$, PGF $_{2\alpha}$ e TXB $_2$) de concentração 1000 ng.mL $^{-1}$ foram preparadas por meio de diluições sucessivas. 50 μL desta solução, 50 μL de uma solução a 200 ng.mL $^{-1}$ de padrão interno (PGB $_2$ -D $_4$) e 50 μL de ácido fórmico foram adicionadas de 900 μL de matriz, extraídas (seção 4.2.1) e analisadas até que fosse estimado através da relação sinal/ruído de 3:1 para o LD e pelo menos 10:1 para o LIQ, até que desejada precisão entre as réplicas fosse alcançada.

4.4.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada durante três dias distintos através do método da padronização interna. Para o preparo das curvas de calibração, alíquotas de 900 μL de matriz de validação foram fortificadas com 50 μL da solução contendo os analitos, 50 μL da solução do padrão interno e 50 μL de ácido fórmico. Após fortificação das amostras, os analitos foram extraídos conforme descrito na seção 4.2.1, de modo a obter sete níveis de concentração em triplicata (Tabela 3), onde a menor concentração da curva corresponde ao LIQ.

Para os compostos uma curva de calibração foi gerada automaticamente pelo *software* Analyst[®] versão 1.4.2 a fim de confirmar a relação linear entre as áreas dos picos dos analitos/área do pico do padrão interno *versus* a concentração dos analitos/concentração do padrão interno. O modelo matemático para gerar a curva foi o método dos quadrados mínimos utilizando regressão linear 1/x. O ângulo, o intercepto e o coeficiente de correlação (r) foram calculados como parâmetros da regressão. Além disso, para cada composto, em cada nível de concentração, foram calculados o desvio padrão relativo (DPR) e o erro relativo (ER%) com a finalidade de monitorar os ajustes de precisão e exatidão dos dados. Para cada nível de concentração as variações de precisão e exatidão não devem exceder 15%, exceto para o LIQ onde não devem ser observadas variações maiores que 20%. O coeficiente de correlação (r^2) deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2012). Além disso, para cada nível da curva de calibração, a precisão e a exatidão também foram

avaliadas. Os níveis relativos aos controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), foram respectivamente 10,0, 100,0 e 150,0 ng.mL⁻¹.

TABELA 3 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Analito	Nível 1 (ng.mL⁻¹)	Nível 2 (ng.mL⁻¹)	Nível 3 (ng.mL⁻¹)	Nível 4 (ng.mL⁻¹)	Nível 5 (ng.mL⁻¹)	Nível 6 (ng.mL⁻¹)	Nível 7 (ng.mL⁻¹)
PGE ₂	5	10	20	50	100	150	200
PGD ₂	5	10	20	50	100	150	200
6-CETO-PGF _{1α}	5	10	20	50	100	150	200
PGF _{2α}	5	10	20	50	100	150	200
TXB ₂	5	10	20	50	100	150	200
PGB ₂ -D ₄ *	100	100	100	100	100	100	100

Dados: *padrão interno

4.4.3 Seletividade

A seletividade foi avaliada através do método de comparação com a matriz. Para a realização deste ensaio, alíquotas de 100 µL de metanol e 50 µL de ácido fórmico foram adicionadas a tubos de polipropileno contendo, separadamente, seis amostras com 900 µL de meio DMEM que passou 24 horas em contato com as células de cultivo. Estas amostras foram submetidas ao processo de extração descrito na Seção 4.2.1.

Em uma segunda etapa, duas alíquotas de 900 µL de meio DMEM, que passou 24 horas em contato com as células de cultivo foram fortificadas com 50 µL da solução dos analitos, 50 µL da solução do padrão interno e 50 µL de ácido fórmico de modo a obter a concentração referente ao LIQ. Estas amostras foram submetidas ao processo de extração descrito na Seção 4.2.1.

Os cromatogramas obtidos com as matrizes isentas dos analitos de interesse foram sobrepostos aos cromatogramas obtidos com o plasma fortificado. As respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito obtido com a matriz fortificada. As

respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% da resposta do PI (BRASIL, 2012).

4.4.4 Amostras de controle de qualidade

As amostras de controle de qualidade (CQ) do limite inferior de quantificação (LIQ), e as de baixa (CQB), média (CQM) e alta concentração (CQA) foram preparadas de maneira similar às amostras da curva de calibração (Tabela 3), porém em cinco réplicas, de acordo com as concentrações descritas na Tabela 4. O critério de aceitação das amostras de CQ é determinado pela obtenção de ao menos 66 % dos controles com desvio inferior a 15 % comparado ao valor nominal da curva de calibração, exceto para o LIQ onde não devem ser observadas variações maiores que 20 % (BRASIL, 2012).

A única amostra de CQ preparada de maneira distinta às amostras da curva de calibração foi a amostra de controle de qualidade de diluição (CQD). O preparo da CQD consistiu em adicionar de 900 μL de matriz com 50 μL dos analitos de modo a obter uma concentração final de 500 ng.mL^{-1} de cada composto, seguido de agitação em vórtex por 3 minutos a 3200 rpm e centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm 0°C. Após esta etapa a amostra foi aliquoteada para tubos de polipropileno (3 de 190 μL) e adicionadas de 710 μL de matriz. As amostras foram novamente agitadas em vórtex por 5 min a 3200 rpm.

TABELA 4: NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE

Compostos	LIQ (ng.mL^{-1})	CQB (ng.mL^{-1})	CQM (ng.mL^{-1})	CQA (ng.mL^{-1})	LSQ (ng.mL^{-1})	CQD (ng.mL^{-1})
PGE ₂	5	10	100	150	200	500
PGD ₂	5	10	100	150	200	500
TXB ₂	5	10	100	150	200	500
PGF _{2α}	5	10	100	150	200	500
6-CETO-PGF _{1α}	5	10	100	150	200	500

4.4.5 Efeito residual

O teste do efeito residual foi realizado para verificar um possível arraste dos analitos e PI gerados por análises anteriores. Para a condução do ensaio, foram realizadas injeções consecutivas de uma amostra de matriz isenta da adição de padrões, uma amostra de matriz fortificada com os analitos de interesse nos níveis mais altos de concentração da curva de calibração (tabela 3) e duas amostras de matriz isenta de adição de padrões. As respostas dos picos interferentes, presentes nas duas amostras de matriz isenta de analitos injetadas após a amostra fortificada, devem ser inferiores a 20% comparado com as respostas dos analitos nas amostras processadas do LIQ. Para o padrão interno (PI), as respostas obtidas com o plasma normal devem ser inferiores a 5% da resposta do PI (BRASIL, 2012).

4.4.6 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas durante três dias consecutivos (intra-dia e inter-dia) através da análise de oito réplicas de amostras controle (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) preparadas conforme descrito na seção 4.4.4.

A precisão foi expressa em termos do desvio padrão relativo (DPR) entre as áreas obtidas de cada composto, em um mesmo nível de concentração. O cálculo do coeficiente de variação é apresentado na Equação 2.

A exatidão foi estimada em cada nível de concentração através cálculo do erro relativo (ER%) obtido entre a concentração teórica e a concentração experimental de cada composto (Equação 3). Os erros de precisão e exatidão devem ser inferiores a 15%, exceto para o CQ-LIQ onde as variações não devem exceder 20% (BRASIL, 2012).

$$\text{DPR} = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad \text{Equação (2)}$$

$$\text{ER\%} = \frac{C_{\text{exp}} - C_{\text{nom}}}{C_{\text{nom}}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Onde C_{exp} é a média da concentração obtida experimentalmente e C_{nom} é a concentração nominal ou real.

4.4.7 Efeito matriz

Para avaliar o efeito matriz, seis alíquotas de 900 µL de matriz obtidas distintamente, foram fortificadas com 100 µL de metanol e 50 µL de ácido fórmico e submetidas ao processo de extração. O extraído foi ressuspendido em 50 µL da solução do PI e 50 µL dos analitos de modo a obter os mesmos níveis de concentração das amostras CQB e CQA. Para cada nível de concentração foi calculado o fator de matriz normalizado (FMN, Equação 4) das respostas obtidas com os analitos em matriz e em solução, preparada nos mesmos níveis de concentração. O efeito da matriz não é significativo quando a variação (CV%) dos fatores de matrizes normalizados relativos a todas as concentrações de um mesmo analito for inferior a 15% (BRASIL, 2012).

$$\text{FMN} = \frac{\frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do PI em matriz}}}{\frac{\text{Resposta do analito em solução}}{\text{Resposta do PI em solução}}} \quad \text{Equação (4)}$$

4.4.8 Testes de estabilidade em matriz

4.4.8.1 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada em matriz sob as condições normais de trabalho do laboratório. Para a condução deste ensaio, alíquotas de 900 μL de matriz foram fortificadas com 50 μL da solução dos analitos, de modo a obter as mesmas concentrações do CQB e do CQA.

As amostras fortificadas foram agitadas em vórtex por 5 minutos a 3200 rpm e em seguida mantidas em bancada por 4 e 6 horas. Após este período, as amostras receberam alíquotas de 50 μL da solução dos padrões internos e 50 μL de ácido fórmico, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQA e do CQB. Após esta etapa as soluções obtidas passaram pelo processo de extração descrito na seção 4.2.1 e injetados no CLAE-EM/EM.

Os resultados obtidos com as amostras armazenadas na bancada foram comparados com a média dos valores das amostras de plasma recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012). O ensaio foi conduzido utilizando seis réplicas preparadas para cada nível de concentração.

4.4.8.2 Estabilidade de pós processamento

A estabilidade pós-processamento foi realizada da mesma forma que a estabilidade de curta duração (seção 4.4.8.1). No entanto, após o processamento, as amostras permaneceram no gerenciador de amostras por períodos de 3, 6 e 8 horas (3 °C). Decorrido esses períodos, as amostras foram analisadas. Os resultados obtidos com as amostras armazenadas foram comparados com a média dos valores das amostras recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração.

O comparativo foi realizado empregando o ER%, o qual não deve exceder 15% (BRASIL, 2012).

4.4.8.3 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade dos analitos também foi determinada em matriz após um, dois e três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando 36 alíquotas de 900 µL de meio de cultivo DMEM, fortificadas nos mesmos níveis de concentração do CQB (18 amostras) e do CQA (18 amostras). As amostras fortificadas foram congeladas por 24 h (-40 °C) e então descongeladas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz (1º ciclo).

Quando completamente descongeladas, um lote de amostras (6 CQB e 6 CQA) passou pelo processo de extração (seção 4.2.1), para posteriormente ser analisado por CLAE-EM/EM. Os outros dois lotes foram novamente congelados (-40 °C) por mais um período de 24 h, e assim sucessivamente até completar três ciclos de congelamento e descongelamento.

Os resultados obtidos com as amostras do ciclo de congelamento e descongelamento foram comparados com a média dos valores obtidos com amostras recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012).

4.4.8.4 Estabilidade de longa duração

Para avaliar a estabilidade de longa duração, 36 alíquotas de 900 µL de matriz foram fortificadas com solução dos analitos, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQB (18 amostras) e do CQA (18 amostras). Após fortificação as amostras foram agitadas em vórtex por 5 minutos a 3200 rpm, e em seguida congeladas (-40 °C) por um período de 10 e 20 dias (período que excedeu o

tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última). Após cada período de tempo, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e passaram pelo método de extração descrito na seção 4.2.1.

Os resultados obtidos com as amostras armazenadas em *freezer* (10 e 20 dias), foram comparados com a média dos valores obtidos com amostras de matriz recém-preparadas. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012).

4.4.9 Testes de estabilidade em solução

4.4.9.1 Estabilidade da solução de trabalho em bancada

A estabilidade das soluções de trabalho em bancada foi realizada após 3 e 5 horas de armazenamento sobre a bancada (21 °C). Após esses períodos, 50 µL da solução de padrão interno e 50 µL da solução dos analitos foram misturadas, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQB e CQA (item 4.4.4). Os resultados obtidos com as amostras armazenadas foram comparados com a média dos valores obtidos com soluções recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER%, o qual não deve exceder 10% (BRASIL, 2012).

4.4.9.2 Estabilidade da solução de trabalho em *freezer*

A estabilidade das soluções de trabalho em bancada foi realizada após 10 e 20 dias de armazenamento em congelador (-40 °C). Para isto, 50 µL da solução de padrão interno e 50 µL da solução dos analitos foram misturadas, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQB e CQA (item 4.4.4). As soluções foram

então congeladas a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após os períodos citados as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e analisadas pelo método desenvolvido. Os resultados obtidos com as amostras armazenadas foram comparados com a média dos valores obtidos com soluções recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER%, o qual não deve exceder 10% (BRASIL, 2012).

4.5 CULTIVO CELULAR DE RAW 264.7

O cultivo celular de RAW 264.7 foi obtido a partir de linhagens celulares pré-existent e então cultivado em meio de eagle modificado por dulbecco completo (DMEM) alta glucose, com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Himedia®, Mumbai, Índia), contendo 1% de soro fetal bovino e 300 mg/mL de penicilina-G e 50 mg/mL de sulfato de estreptomicina, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em meio de 5% de CO_2 , até subconfluência. Ao atingir a subconfluência, a cultura foi repicada, ressuspendendo as células com o auxílio de raspador de células do tipo rodinho, que foram passadas de garrafas para placas com poços de 3,29 mL, de tal forma que se obteve uma proporção de 5×10^5 células por mL de meio, nesta etapa utilizou-se a proporção de 10% de soro fetal bovino para garantir o crescimento. Passadas 48 horas os tratamentos foram adicionados no cultivo celular, e 24 horas após procedeu-se com os ensaios de proliferação e viabilidade celular. A cada 24 horas o meio de cultivo foi trocado com a adição de 1% de soro fetal bovino. As células foram usadas para os testes somente após dez passagens (TAKABATAKE *et al.*, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CÉLULAS RAW 264.7

As células RAW 264.7 são uma linhagem de macrófagos de rato, sendo promotoras da inflamação quando o meio em que estão sendo cultivadas é enriquecido com um indutor de inflamação, como, por exemplo, o LPS (lipopolissacarídeo) e por este motivo são utilizadas frequentemente para estudos de atividade anti-inflamatória.(CUETARA et al., 2006; WANG et al., 2012).

Quando cultivadas em meio suplementado com soro fetal bovino e antibiótico em concentração adequada, as células RAW 264.7 proliferam rapidamente e em quantidade abundante. Sob estas condições, a observação direta do frasco de cultivo, com o uso microscopia de luz invertida, demonstra que estas células aderem-se à base do frasco sendo classificadas como células do tipo aderentes, sendo evidenciadas projeções citoplasmáticas e vacúolos como pode ser observado na Figura 10. Após o cultivo de diferentes lotes de células, o meio de cultivo foi drenado e este então utilizado como matriz para validação do método analítico.

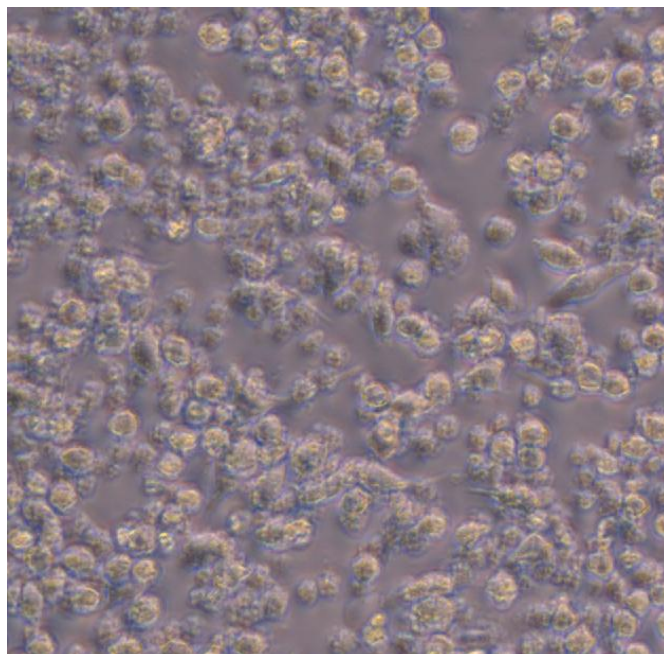


FIGURA 10 – ASPECTO FENOTÍPICO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM RAW 264.7 UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS

Fonte: O autor (2016)

5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE-EM/EM

Para o desenvolvimento do método bioanalítico por CLAE-EM/EM, o primeiro passo foi a escolha da fonte de ionização. Optou-se por *Electrospray* (ESI) a qual permite ionizar compostos de média a alta polaridade, sendo uma técnica de ionização dita como “branda”, a qual é frequentemente utilizada na análises de compostos lábeis.

A próxima etapa foi checar o sinal dos analitos (íon precursor). Para tanto, soluções de trabalho contendo 250 ng.mL^{-1} de cada composto foram preparadas em acetonitrila:água (50:50, v/v) contendo 0,1 % de ácido fórmico e infundidas diretamente no espectrômetro de massas. Após a identificação do sinal de cada composto, foram ajustadas as concentrações das soluções a fim de garantir uma intensidade de sinal adequada entre 2×10^5 e 1×10^6 cps (Figura 11), intensidade esta recomendada pelo fabricante do equipamento para otimização automática dos parâmetros individuais dos compostos (Tabela 5) via Monitoramento de Reações Múltiplas(MRM).

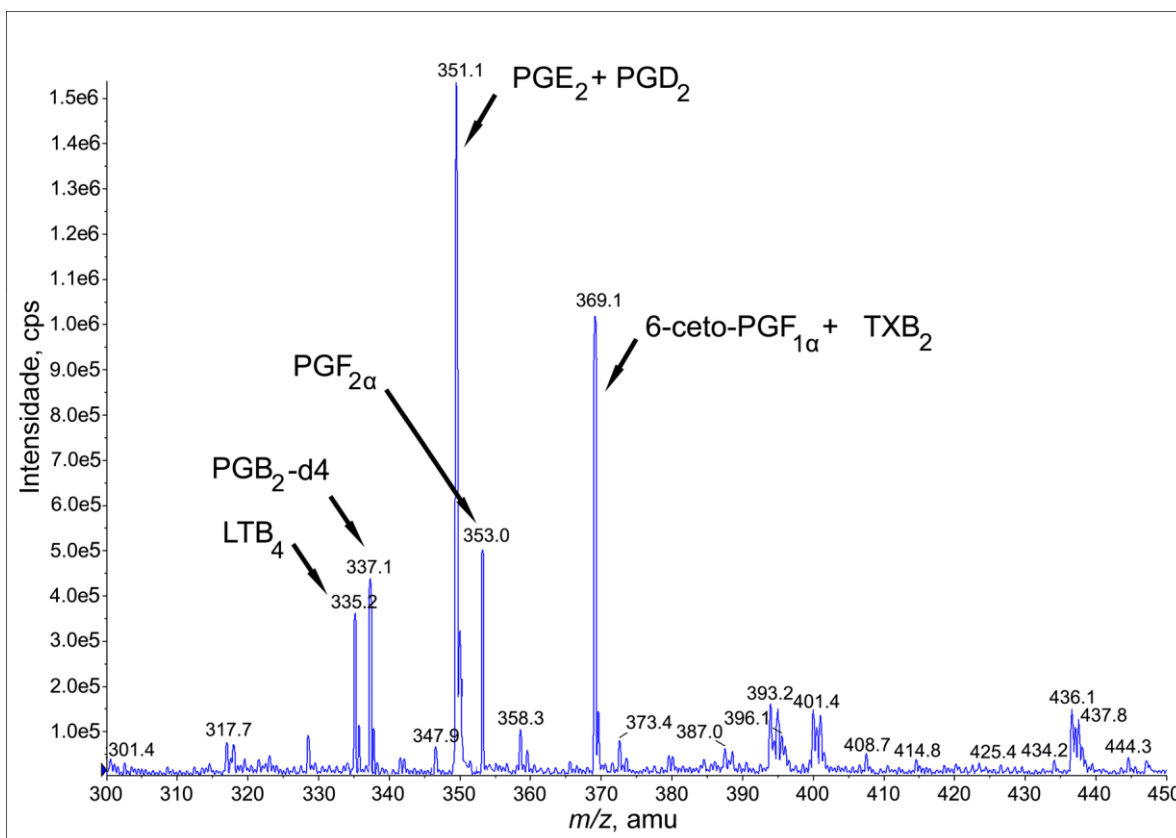


FIGURA 11 – ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO POR INFUSÃO DIRETA DE PGE_2 , PGD_2 , 6-CETO- $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$, TXB_2 E $\text{PGB}_2\text{-d}_4$ A 250 ng.mL^{-1} UTILIZANDO ACETONITRILA:ÁGUA 50:50 (V:V) CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO.

Ao término da otimização automática via MRM, ficou definido que o modo negativo de ionização foi o mais eficiente para ionizar os compostos de interesse. Isso se deve ao fato de que todos os compostos em estudo serem hidroxilados o que favorece a desprotonação. Foram obtidos os dois fragmentos de íons mais intensos de cada composto. O fragmento de maior intensidade foi utilizado para quantificação, enquanto que o segundo maior em intensidade, para qualificação do sinal analítico de cada substância.

TABELA 5 – PARÂMETROS DE VOLTAGEM OTIMIZADOS ATRAVÉS DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DE PGE_2 , PGD_2 , TXB_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ e $\text{PGB}_2\text{-d}_4$ (continua)

Analito	Q1	Q3	DT	DP	EP	CEP	CE	CXP
PGE_2 e PGD_2	351	271	200	-25	-5	-20	-22	-20
PGE_2 e PGD_2	351	315	200	-25	-5	-20	-14	-22
TXB_2	369	169	200	-35	-5	-20	-24	-2

TABELA 5 – PARÂMETROS DE VOLTAGEM OTIMIZADOS ATRAVÉS DE *MRM* PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DE PGE_2 , PGD_2 , TXB_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ e $\text{PGB}_2\text{-d4}$ (conclusão)

TXB_2	369	195	200	-35	-5	-20	-18	-14
$\text{PGF}_{2\alpha}$	353	193	200	-50	-4,5	-20	-30	-4
$\text{PGF}_{2\alpha}$	353	309	200	-50	-4,5	-20	-25	-4
6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (PGL_2)	369	163	200	-40	-4,5	-20	-34	0
6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (PGL_2)	369	83	200	-40	-4,5	-20	-30	0
$\text{PGB}_2\text{-d4}$	337	113	200	-45	-4,5	-20	-34	0
$\text{PGB}_2\text{-d4}$	337	179	200	-45	-4,5	-20	-30	0

Dados: Q1 – Íon precursor; Q3 – Íon Fragmento; DT - Tempo de permanência; DP - Potencial de desagregação; EP - Potencial de entrada; CEP - Potencial de entrada na célula de colisão; CE - Energia de colisão; CXP - Potencial de saída da célula de colisão

A próxima etapa de otimização do espectrômetro de massas foi o ajuste dos parâmetros da fonte de ionização. Esse ajuste foi realizado por meio de análises por injeção em fluxo (FIA), acoplando o cromatógrafo ao espectrômetro de massas, sem o uso de coluna cromatográfica. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (50:50 v/v), com fluxo de $200 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ e volume de injeção de $10 \mu\text{L}$. A posição vertical do capilar do *Eletrospray* foi ajustada para 3 mm, e a horizontal para 5 mm.

Os parâmetros otimizados nessa etapa foram: gás de interface (CUR): 10 psi, gás de colisão (CAD): 10 psi, gás de nebulização (GS1): 50 psi, gás auxiliar (GS2): 40 psi, voltagem do capilar (IS): -4500 V e temperatura da fonte: 450°C .

Ao término das otimizações do espectrômetro de massas, prosseguimos com o desenvolvimento de método cromatográfico (CLAE-EM/EM). Os primeiros testes foram realizados utilizando método proposto por Martins (2013). Este método utilizava uma coluna XBRIDGE C18 (2,1 x 100 mm; $5 \mu\text{m}$ Waters® Corporation) e fase móvel composta de diferentes proporções de água e acetonitrila (Tabela 6), utilizando como aditivo 0,1% de ácido fórmico.

TABELA 6 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL, DESENVOLVIDO POR MARTINS (2013)

TEMPO (min)	FLUXO ($\mu\text{L}/\text{min}$)	SOLVENTES	
		Água 0,1% AFO (%)	Acetonitrila 0,1% AFO (%)
0,0	300	65	35
5,0	300	65	35
5,1	300	50	50
7,5	300	50	50
7,6	300	65	35
13,0	300	65	35

Nota: AFO – Ácido fórmico

Apesar de ser um método que separava adequadamente os analitos inicialmente propostos (PGE_2 e PGD_2), utilizava uma coluna com grande tamanho de partícula. O baixo fluxo utilizado do método inicial ($300 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$) ocasionava empicos alargados e tempos de corrida relativamente altos (12 min). Além disso, verificou-se que a injeção dos 5 prostanóides de maneira simultânea fez com que os picos dos analitos eluíssem praticamente no mesmo tempo de retenção. Diversos testes foram realizados, porém devido à pequena eficiência cromatográfica da coluna em questão não foi possível definir um gradiente que promovesse a separação dos analitos em tempo menor que 10 minutos.

Com o objetivo de diminuir o tempo de corrida aliado a uma análise cromatográfica adequada foram avaliadas diversas colunas de mesma polaridade, mas com diferentes diâmetros, larguras e tamanhos de partícula.

Com o objetivo de alcançar uma análise adequada, foram testadas colunas de maior empacotamento: Aquity BEH C-18 (2,1 x 100 mm 1,7 μm) ;ZORBAX Eclipse XDB C-18 (4,6 x 150 mm 3,5 μm); ZORBAX Eclipse XDB C-18 (2,1 x 50 mm 1,8 μm); ZORBAX Eclipse XDB C-18 (4,6 x 50 mm 1.8 μm).

O uso da coluna Aquity BEH C-18 2,1 x 100 mm 1,7 μm mostrou não haver melhora no tempo de corrida por apresentar limitações quanto ao limite de pressão de 300 bar, devido aos peeks de plástico internos do cromatógrafo, ocasionando em limite de fluxo de no máximo $300 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$.

Devido ao grande comprimento, aliado ao tamanho de partícula, a coluna ZORBAX Eclipse XDB C-18 (4,6 x 150 mm 3,5 μm), se mostrou ineficiente para realizar a separação de todos os analitos em tempo inferior ao proposto por Martins (2013). Desta forma escolhemos colunas que possuíam tamanho de partícula de 1,8 μm , mas que possuissem largura de 4,6 mm, o que aumentaria a área de contato interno da coluna seguida de aumento na eficiência cromatográfica pelo

aumento de número de pratos teóricos, possibilitando então o emprego de fluxos adequados e pressões mais baixas. A próxima coluna a ser testada então foi a ZORBAX Eclipse XDB C-18 (4,6 x 150 mm 1,8 µm). Inicialmente utilizou-se como base o método proposto por Martins (2013), que com o auxílio de software *Acquity UPLC Calculator* sofreu as devidas mudanças no gradiente (Tabela 7).

TABELA 7 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL PARA COLUNA ZORBAX Eclipse XDB C-18 (4,6 x 150 mm 1,8 µm) COM BASE EM MÉTODO PROPOSTO POR MARTINS (2013).

TEMPO (min)	FLUXO (µL/min)	SOLVENTES	
		Água 0,1% AFO (%)	Acetonitrila 0,1% AFO (%)
0,0	500	70	30
2,5	500	70	30
2,51	500	25	75
4,3	500	25	75
4,31	500	70	30
20,00	500	70	30

Nota: AFO – Ácido fórmico

No entanto a mudança brusca na concentração de água de 70% para 30% em apenas 6 segundos não promoveu uma separação adequada dos analitos (Figura 12).

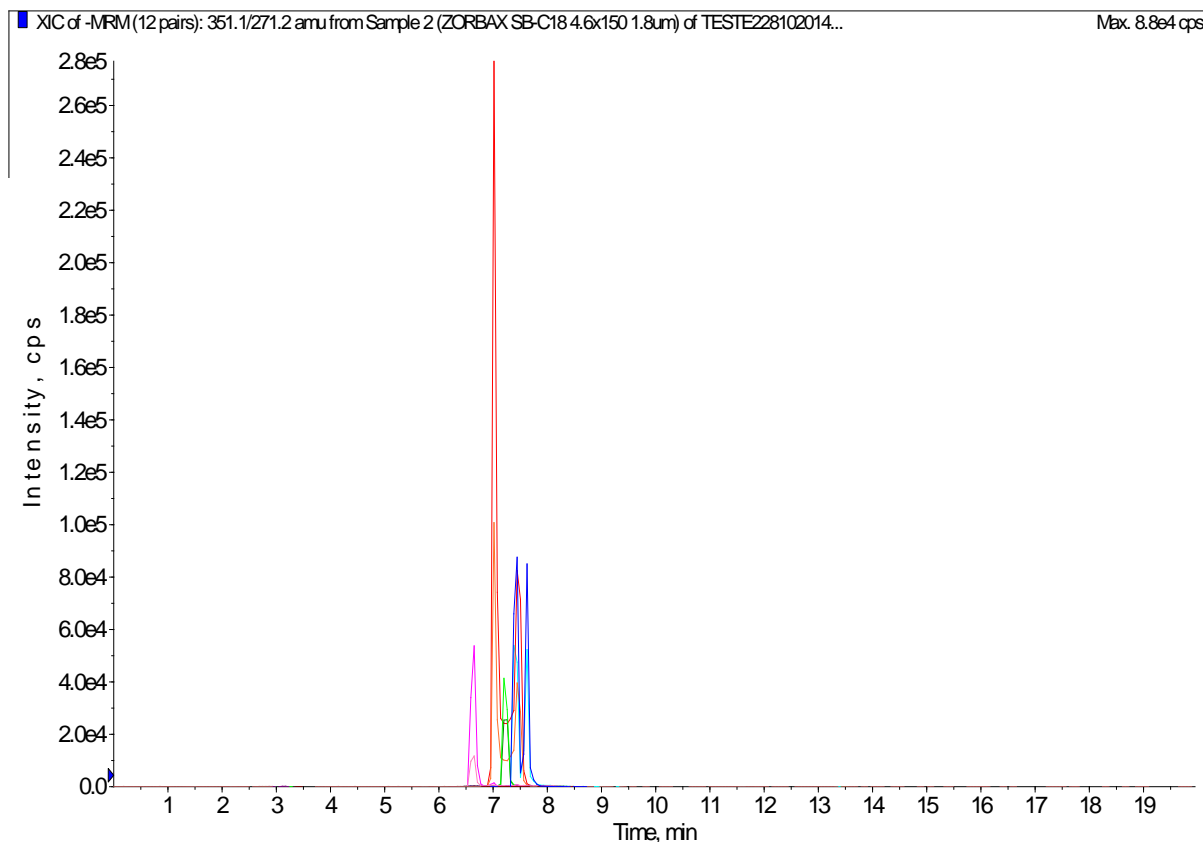


FIGURA 12 – CROMATOGRAMA INICIAL OBTIDO POR CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX SB-C18 (4,6 X 150 mm 1,8 μ m) E GRADIENTE DESCRITO NA TABELA 7.

Desta forma, foi necessária uma mudança menos brusca e uma diminuição na proporção inicial de água (Tabela 8) para que a separação correta fosse alcançada (Figura 13).

TABELA 8 – SEGUNDO GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL PARA COLUNA ZORBAX Eclipse XDB C-18 (4,6 x 150 mm 1,8 μ m)

TEMPO (min)	FLUXO (μ L/min)	SOLVENTES	
		Água 0,1% AFO (%)	Acetonitrila 0,1% AFO (%)
0,0	600	50	50
3,50	600	25	75
3,51	600	50	50
12,00	600	50	50

Nota: AFO – Ácido fórmico

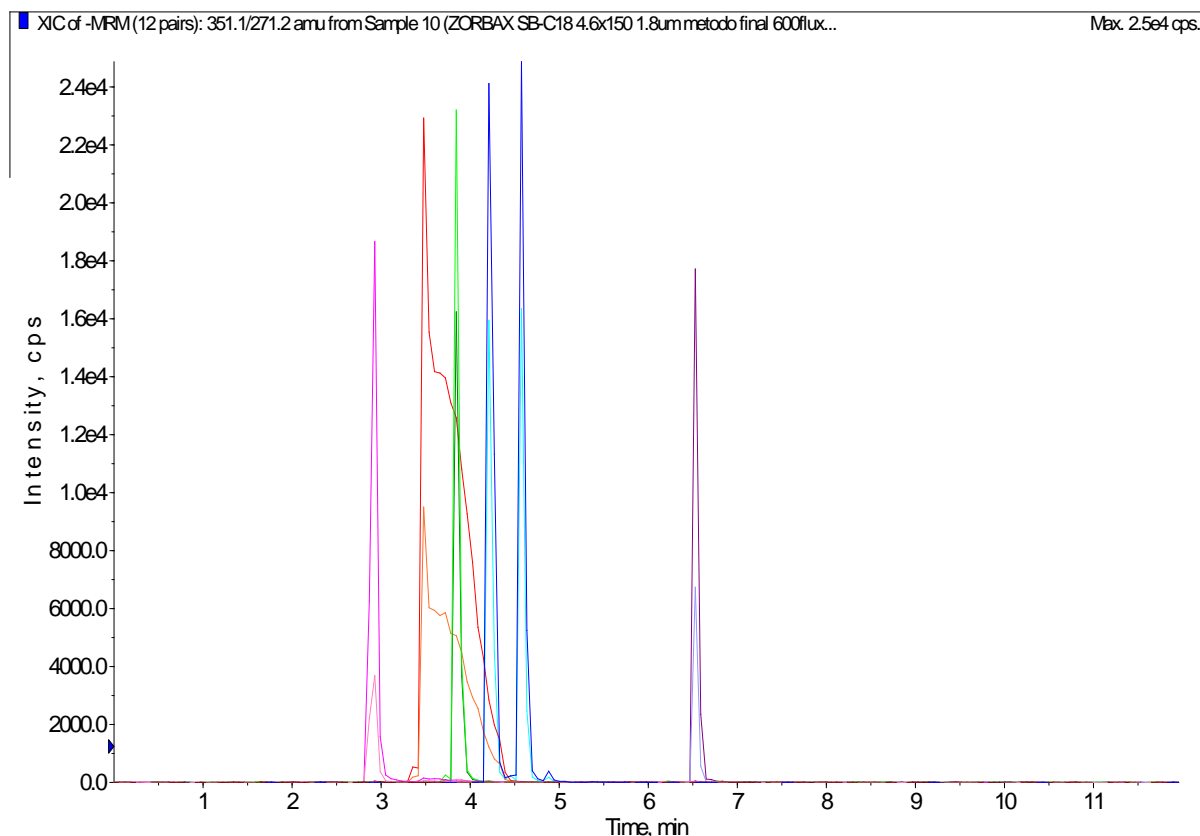


FIGURA 13 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX SB-C18 (4,6 X 150 mm 1,8 μ m) E GRADIENTE DESCRITO NA TABELA 8.

Conforme podemos observar na Figura 14 o aumento na concentração de ácido fórmico na fase móvel de 0,1 % para 0,25 % proporcionou uma melhora na forma dos picos, efeito este visível no pico do TXB₂. Fato este ocasionado pela propriedade deste analito apresentar-se em duas isoformas interconvertíveis (Figura 15), fenômeno este provavelmente dependente de pH.

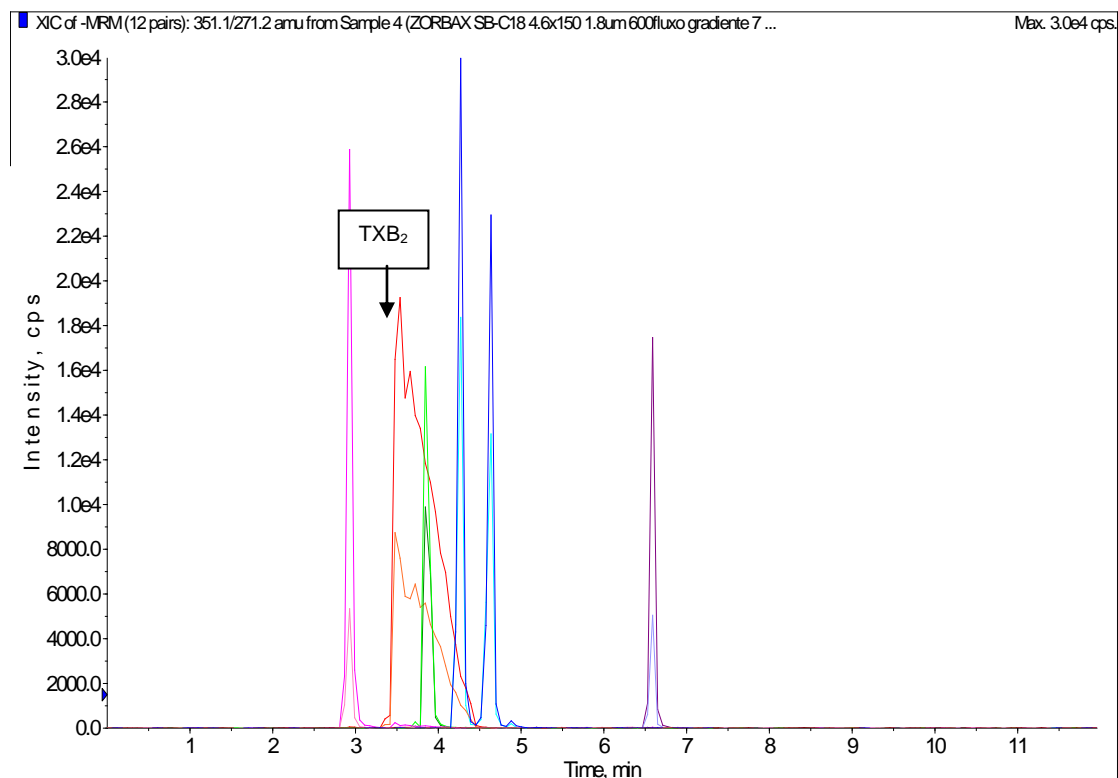


FIGURA 14 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX SB-C18 (4,6 X 150 mm 1,8 μ m) COM ADIÇÃO DE 0,25% DE ÁCIDO FÓRMICO NA FASE MÓVEL.

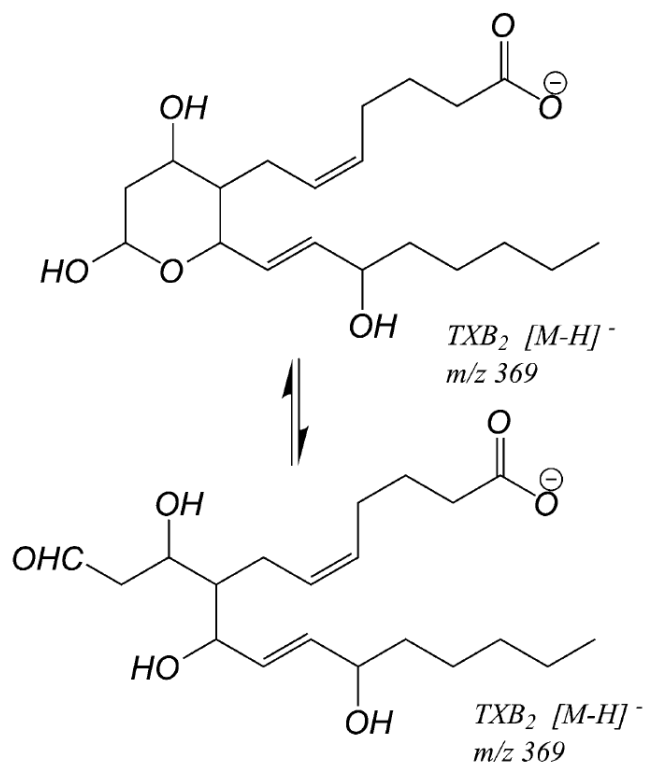


FIGURA 15 – FORMAS TAUTOMÉRICAS DO TROMBOXANO B₂ (TXB₂ PARA 2,3-DINOR-TXB₂).
FONTE: MURPHY et al., 2005

Conforme mostrado na Figura 16, o aumento de temperatura de 35 para 50 °C melhorou consideravelmente o pico do TXB₂. Entretanto, temperaturas mais altas que 50 °C não mudaram expressivamente o cromatograma e, por isso, a coluna foi mantida a 50 °C.

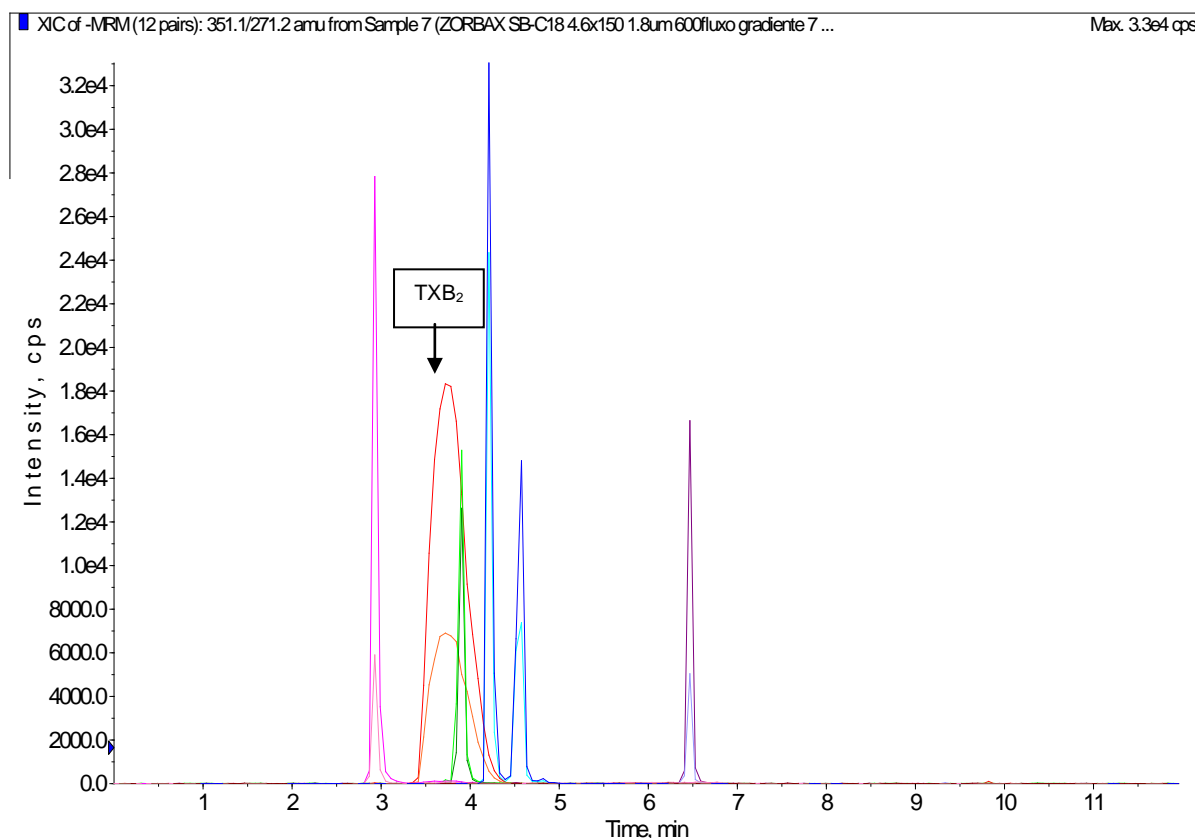


FIGURA 16 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX SB-C18 (4,6 X 150 mm 1,8 µm) E MANTENDO O FORNO DE COLUNA EM 50 °C.

Este método desenvolvido, apesar de promover a separação correta dos analitos em baixo tempo, apresentava tempo de corrida equivalente ao método de partida devido ao alto tempo de estabilização da coluna. Desta forma, com o auxílio do software *Acquity UPLC Calculator*, o método foi novamente transposto para a coluna ZORBAX Eclipse XDB C-18 (4,6 x 50 mm 1,8 µm), sendo o gradiente utilizado descrito na Tabela 9.

TABELA 9 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL PARA COLUNA ZORBAX XDB C-18 (4,6 x 50 mm 1,8 µm)

TEMPO (min)	FLUXO (µL/min)	SOLVENTES	
		Água 0,25% AFO (%)	Acetonitrila 0,25% AFO (%)
0,0	600	50	50
1,17	600	25	75
1,18	600	50	50
4,00	600	50	50

Nota: AFO – Ácido fórmico

O método, no entanto teve de ser modificado para resultar em picos mais simétricos e afilados, e em uma melhor separação cromatográfica dos analitos PGE₂ e PGD₂. O aumento na concentração de aditivo, no fluxo da fase móvel e na proporção de acetonitrila no gradiente inicial (Tabela 10) resultou em picos mais afilados, sendo então definido como o método a ser validado (Figura 17).

TABELA 10 – SEGUNDO GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL PARA COLUNA ZORBAX XDB C-18 (4,6 x 50 mm 1,8 µm)

TEMPO (min)	FLUXO (µL/min)	SOLVENTES	
		Água 1% AFO (%)	Acetonitrila 1% AFO (%)
0,0	700	55	45
1,17	700	25	75
1,18	700	55	45
4,00	700	55	45

Nota: AFO – Ácido fórmico

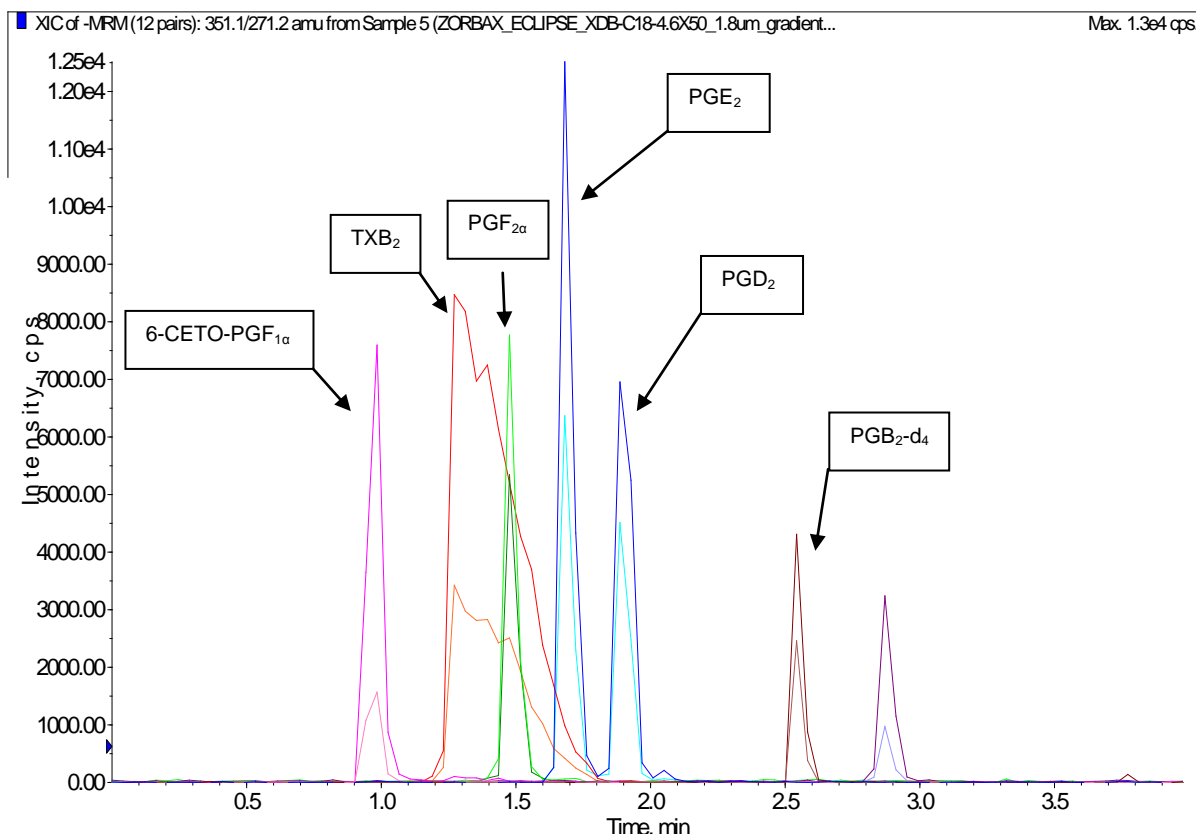


FIGURA 17 – CROMATOGRAMA FINAL OBTIDO POR CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COLUNA ZORBAX SB-C18 (4,6 X 50 mm 1,8 μ m).

A adição de 1 % de ácido fórmico resultou em um pH de fase móvel próximo ao limítrofe tolerado pela coluna (próximo a 2) em questão e foi definido como o ideal para a corrida.

Com o objetivo de aumentar a vida útil da coluna utilizada, modificou-se a temperatura do forno de coluna de 50 °C para 40 °C, visto que a sua diminuição não resultou em mudanças significativas no cromatograma obtido. Testes conduzidos com fluxos maiores que 700,0 μ L.min⁻¹ também não demonstraram benefícios significativos, pois o aumento do fluxo da fase móvel aproximou o analito 6-CETO-PGF_{1α} do volume morto.

5.3 EXTRAÇÃO

Com o desenvolvimento do método por CLAE-EM/EM concluído, foi desenvolvido o método de extração dos analitos (PGE₂, PGD₂, TXB₂, 6-CETO-PGF_{1α}, e PGF_{2α}) da matriz biológica.

O desenvolvimento do método de extração foi realizado primeiramente utilizando cartuchos de extração em fase sólida (HLB OasisTM Waters®, 30 µm de poro, 30 mg de fase estacionária copolimérica, capacidade de 1 mL), através do auxílio de sistema *Manifold* (Waters®, Milford-Massachussetts, USA). Método este desenvolvido por MARTINS (2013). Observou-se, no entanto que a extração em fase sólida era laboriosa, além de ser demorada e dispendiosa. A técnica obteve uma boa eficiência para os compostos PGE₂ e PGD₂, mas para o restante dos analitos esta extração se deu de modo falho sendo o composto 6-CETO-PGF_{1α} suprimido do cromatograma (Figura 18).

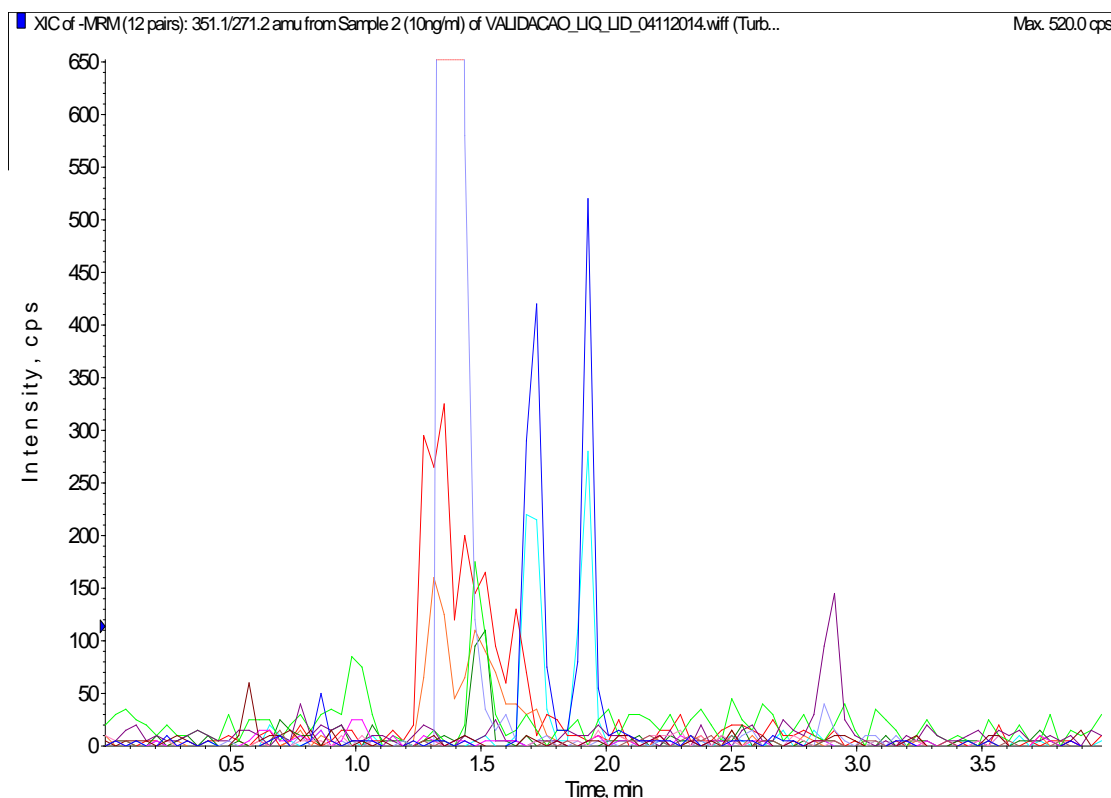


FIGURA 18 – CROMATOGRAMA DE AMOSTRA OBTIDA POR MEIO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.

FONTE: O autor (2016)

Por este motivo, optou-se pela extração via líquido-líquido, técnica esta sabidamente mais simples, rápida e barata. Para o desenvolvimento do método, diversas condições foram testadas a fim de se obter a máxima eficiência de extração para todos os compostos analisados. Primeiramente definiram-se os melhores líquidos extratores, para posteriormente determinar a melhor condição de extração. Por último ajustes nos tempos de centrifugação e quantidade recuperada foram definidos a fim de se obter a melhor condição de extração. Após o desenvolvimento do método observamos que a recuperação para as prostaglandinas PGE_2 e PGD_2 foi praticamente equivalente se comparada ao método por extração em fase sólida, porém podemos observar na Figura 19 um aumento considerável em todos os outros analitos em estudo.

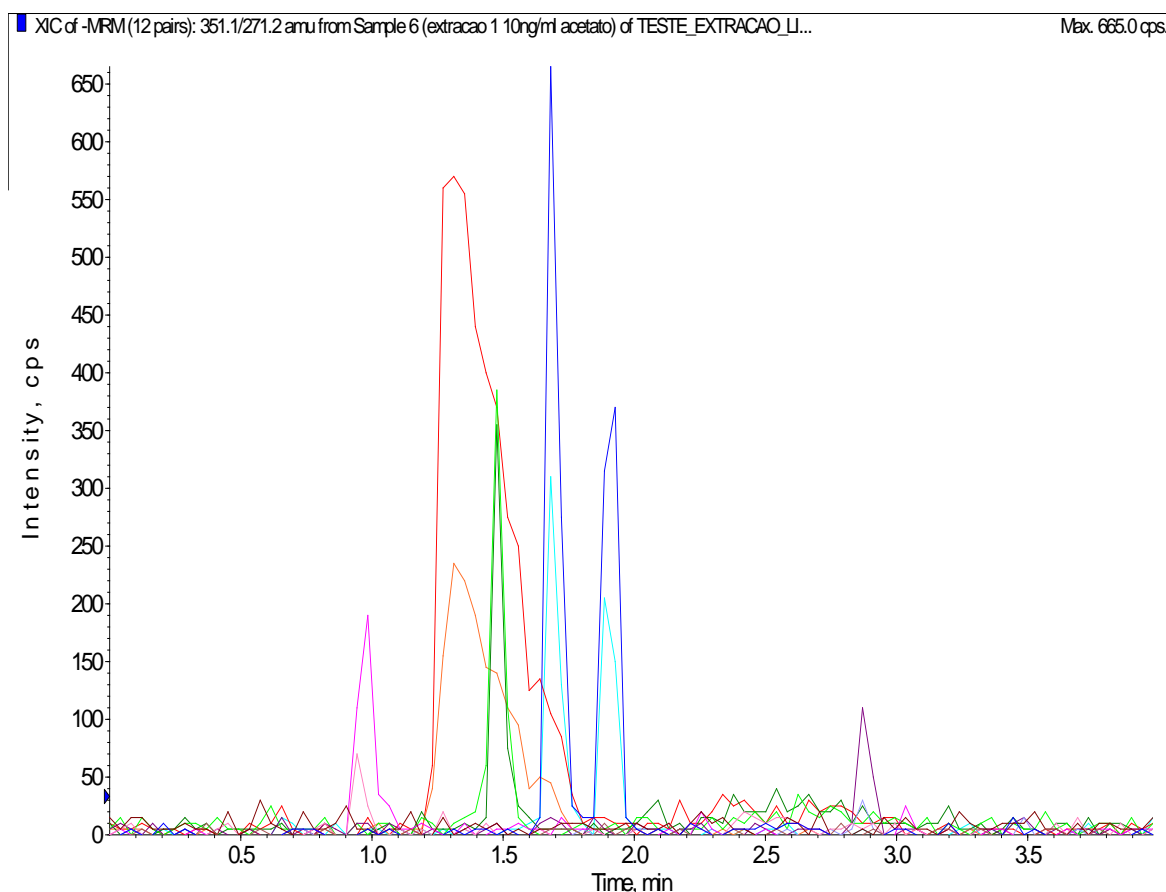


FIGURA 19 – CROMATOGRAMA DE AMOSTRA OBTIDA POR MEIO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

FONTE:O autor (2016)

O comparativo entre as porcentagens de recuperação para cada analito entre as técnicas de extração em fase sólida (EFS) e a extração líquido-líquido (ELL) se encontra detalhado na Tabela 11. O critério de escolha do método de extração foi baseado no maior percentual de recuperação para todos os analitos, que se mostrou obter reprodutibilidade aceitável.

TABELA 11 – COMPARATIVO ENTRE AS PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO PARA PGE_2 , PGD_2 , 6-CETO- $PGF_{1\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$, E TXB_2 ENTRE AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS) E A EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL)

Técnica extrativa	Analito	% de recuperação
ELL	PGE_2	70,49
ELL	PGD_2	83,96
ELL	TXB_2	82,72
ELL	6-CETO- $PGF_{1\alpha}$	71,00
ELL	$PGF_{2\alpha}$	83,08
EFS	PGE_2	61,08
EFS	PGD_2	66,63
EFS	TXB_2	34,09
EFS	6-CETO- $PGF_{1\alpha}$	6,14
EFS	$PGF_{2\alpha}$	34,04

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

5.4.1 Seletividade

O ensaio de seletividade foi realizado através do método da comparação da matriz. Assim, a matriz foi avaliada quanto a possível presença de interferentes significativos. De acordo com a Figura 20, não houve presença de interferentes na matriz biológica utilizada nos mesmos tempos de retenção dos analitos e do padrão interno. Desse modo, o método demonstrou que é seletivo para análise de PGE_2 ,

PGD₂, 6-CETO-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TXB₂ e PGB₂-d4 (PI), em meio de cultivo DMEM oferecendo confiabilidade sobre a identidade dos compostos monitorados.

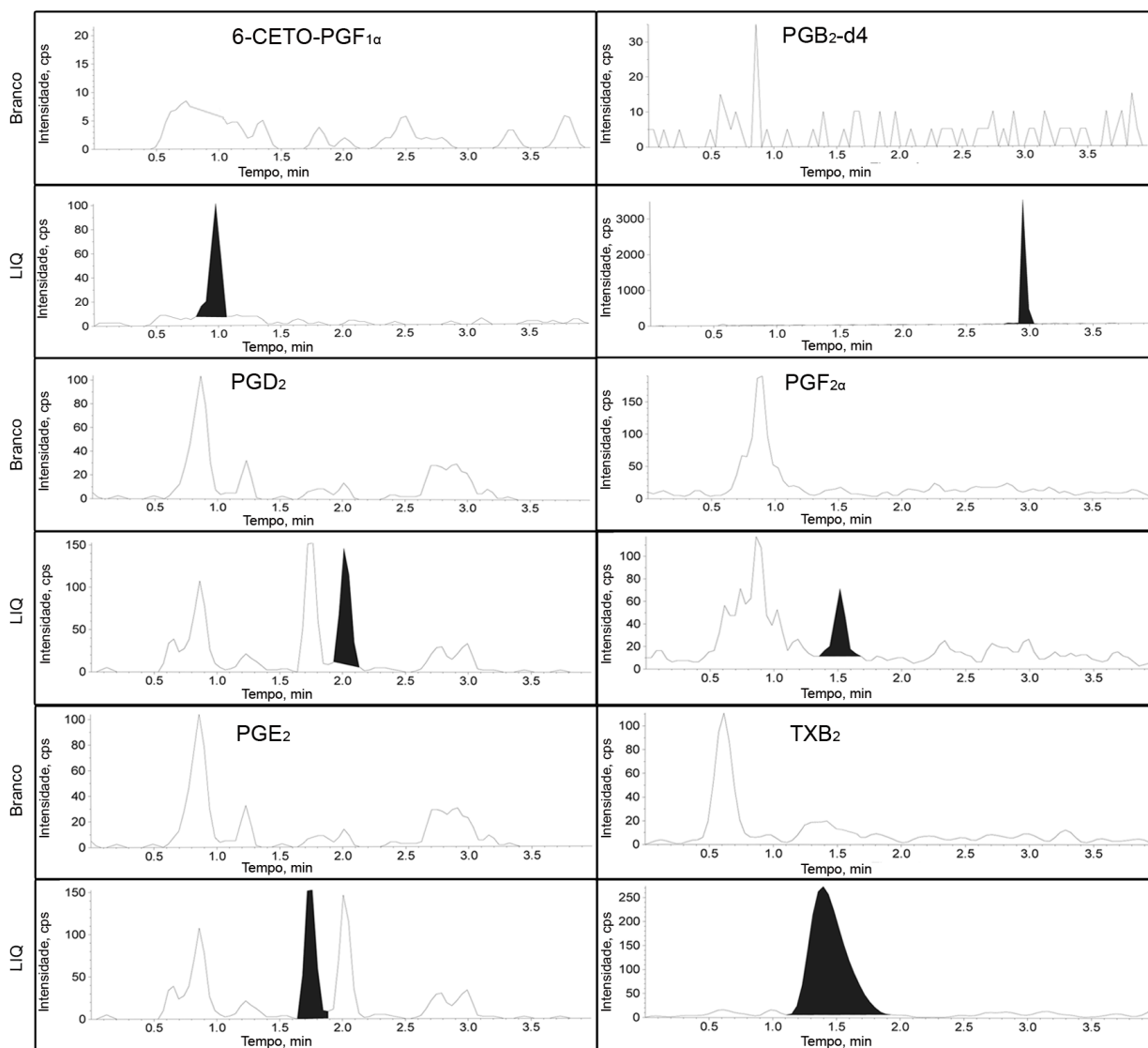


FIGURA 20 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) PARA AVALIAR A SELETIVIDADE DO MÉTODO NAS TRANSIÇÕES MONITORADAS DE PGE₂, PGD₂, 6-CETO-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TXB₂ e PGB₂-d4.

Dados: branco e meio de cultivo DMEM na concentração do LIQ (Seção 6.8.4)

FONTE: O autor (2016)

5.4.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram avaliados a partir da relação sinal ruído oferecida pelos cromatogramas (mínimo de 3 e 10 vezes, respectivamente). Dessa forma, uma amostra de concentração conhecida de matriz fortificada com os padrões analíticos de PGE_2 , PGD_2 , 6-CETO-PGF $_{1\alpha}$, PGF $_{2\alpha}$, e TXB $_2$ foi diluída sucessivamente e injetada até a obtenção do menor pico detectável. Conforme demonstrado na Tabela 12, o método demonstrou boa sensibilidade, com valores de LD de 1 ng.mL $^{-1}$ e LQ de 5 ng.mL $^{-1}$ para todos os analitos testados.

TABELA 12 – VALORES DE LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO PARA A PGE_2 , PGD_2 , 6-CETO-PGF $_{1\alpha}$, PGF $_{2\alpha}$, E TXB $_2$

METABÓLITOS	LIMITE DE DETECÇÃO	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO
	(ng.mL $^{-1}$)	(ng.mL $^{-1}$)
PGE_2	1	5
PGD_2	1	5
6-CETO-PGF $_{1\alpha}$	1	5
PGF $_{2\alpha}$	1	5
TXB $_2$	1	5

5.4.3 Linearidade

A linearidade foi determinada em sete níveis de concentração, contemplando as faixas de 5 a 200 ng.mL $^{-1}$. A análise de regressão demonstrou que as curvas de calibração para todas as substâncias foram lineares com valor do coeficiente de correlação (r) superior ao estabelecido pela RDC Nº 899/2003 da ANVISA, que preconiza valores de “ r ” iguais ou superiores a 0,98. Além disso, os erros de precisão e exatidão obtidos em cada nível de concentração foram considerados satisfatórios visto que erros menores de 20 % em relação a concentração nominal para os padrões do LIQ e 15 % podem ser aceitos para os outros padrões de

calibração em métodos bioanalíticos de acordo com a RDC Nº 27/2012 da ANVISA. Em virtude dos resultados obtidos, pode-se inferir que dentro da faixa de concentração estabelecida, o método desenvolvido garante uma resposta linear precisa e exata para PGE_2 , PGD_2 , 6-CETO-PGF_{1 α} , PGF_{2 α} , e TXB₂.

A regressão linear do ensaio é apresentada nas Figuras (21, 22, 23, 24, e 25) enquanto que os valores individuais de precisão e exatidão calculados para cada nível de concentração são demonstrados nas Tabelas 13, 14, 15, 16 e 17.

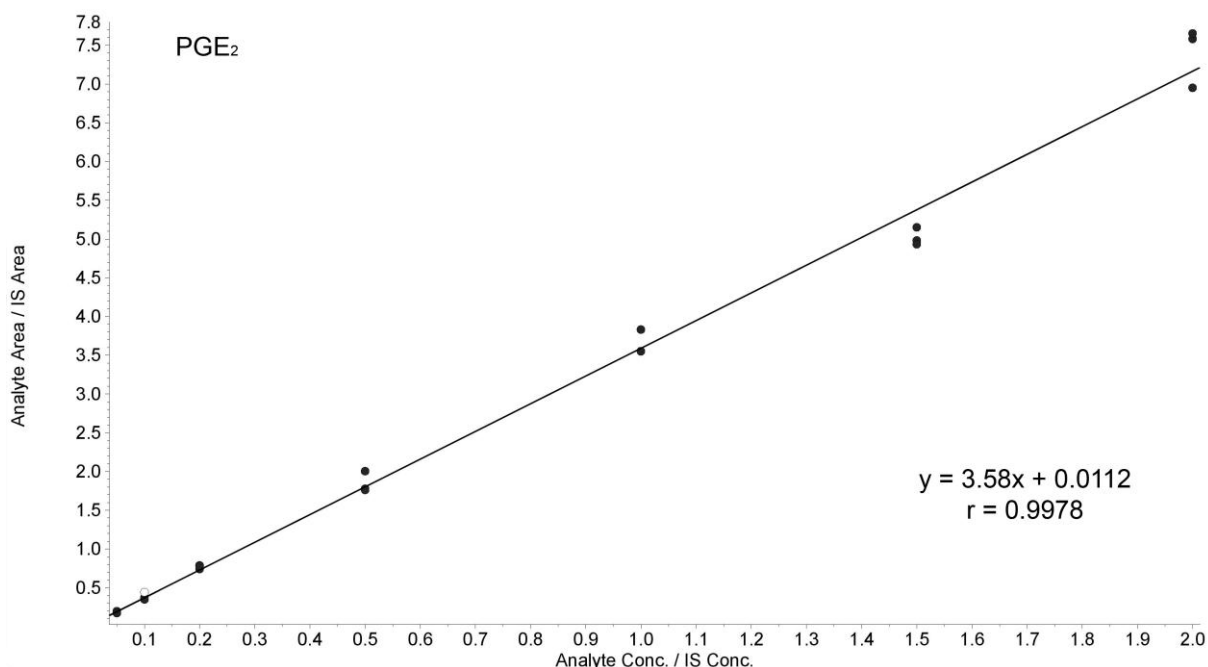


FIGURA 21 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGE₂, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em meio DMEM, em triplicata e em sete níveis de concentração.

TABELA 13– VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGE₂

COMPOSTO	Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)	Concentração determinada (ng.mL ⁻¹)	Desvio padrão (ng.mL ⁻¹)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
PGE ₂	5	4,75	0,374	7,88	-5,03
	10	9,80	0,549	5,61	-2,03
	20	21,15	0,695	3,29	5,73
	50	51,28	3,787	7,38	2,56
	100	101,53	4,498	4,43	1,53
	150	140,03	3,205	2,29	-6,65
	200	206,40	10,800	5,23	3,20

Dados: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo.

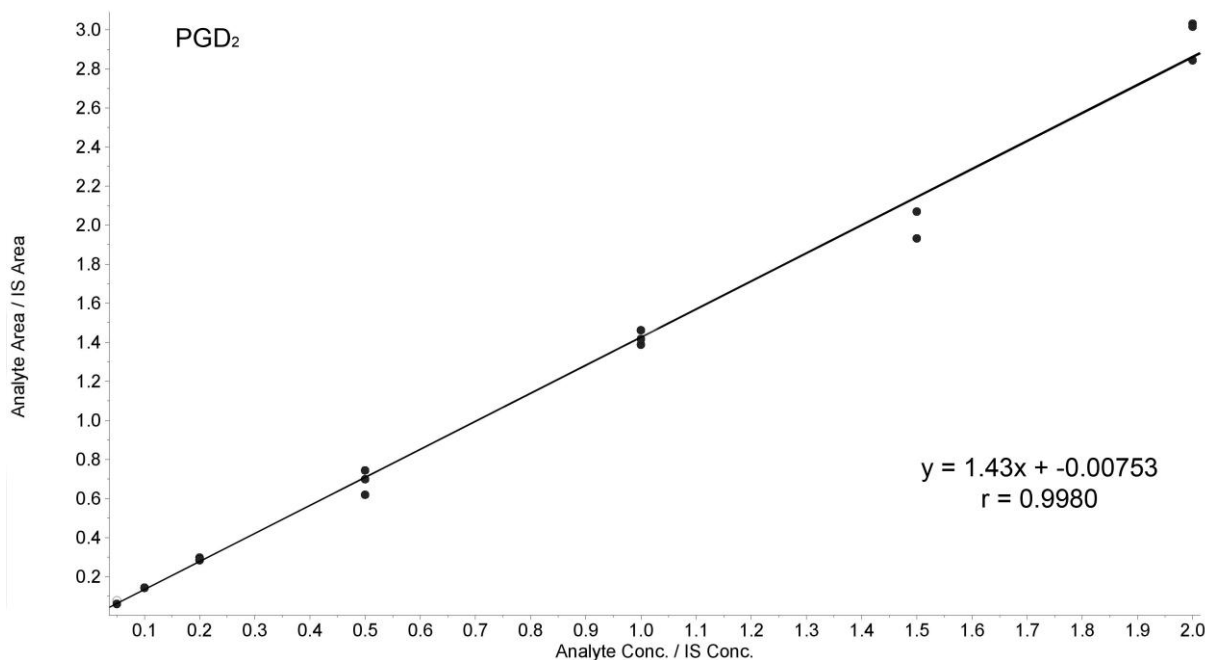


FIGURA 22 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGD₂, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em meio DMEM, em triplicata e em sete níveis de concentração.

TABELA 14– VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGD₂

COMPOSTO	Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)	Concentração determinada (ng.mL ⁻¹)	Desvio padrão (ng.mL ⁻¹)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
PGD ₂	5	4,90	0,096	1,97	-2,06
	10	10,60	0,621	5,86	6,03
	20	21,94	0,361	1,64	9,71
	50	45,07	1,699	3,77	-9,86
	100	97,15	3,775	3,89	-2,85
	150	143,45	1,849	1,29	-4,37
	200	215,53	7,208	3,34	7,76

Dados: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo.

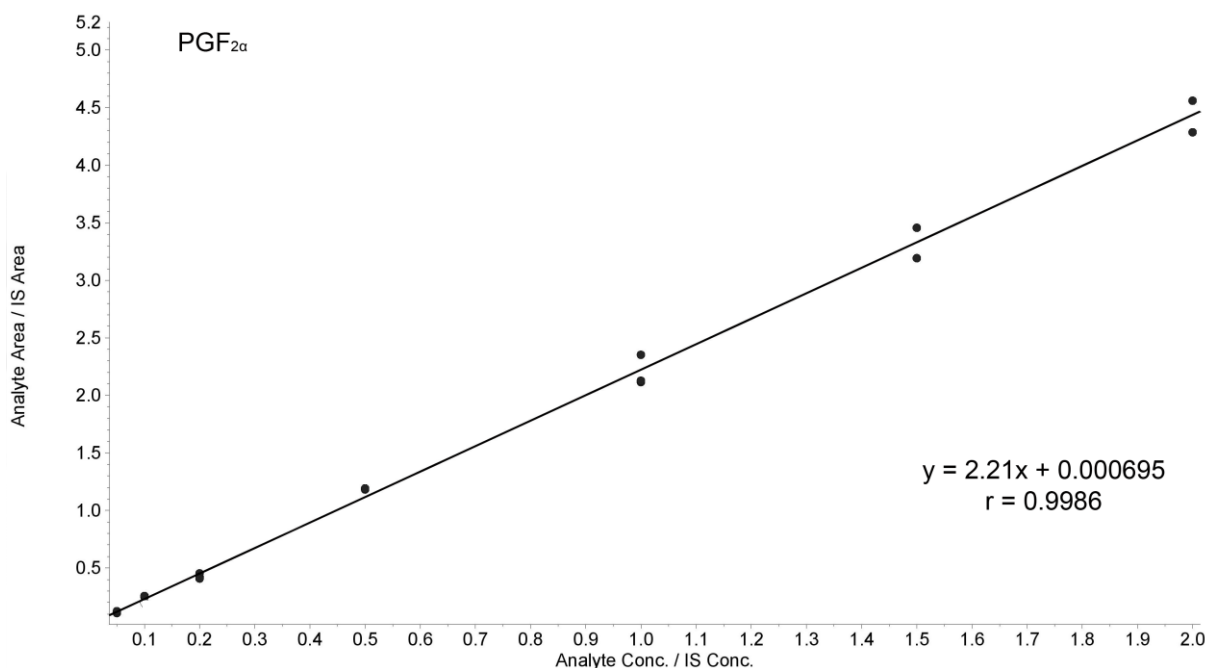


FIGURA 23 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGF_{2α}, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em meio DMEM, em triplicata e em sete níveis de concentração.

TABELA 15– VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA PGF_{2α}

COMPOSTO	Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)	Concentração determinada (ng.mL ⁻¹)	Desvio padrão (ng.mL ⁻¹)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
PGD ₂	5	4,76	0,417	8,77	-4,83
	10	11,04	0,287	2,60	10,40
	20	18,99	1,027	5,41	-5,04
	50	53,21	0,235	0,44	6,43
	100	98,94	6,031	6,10	-1,06
	150	149,77	8,431	5,63	-0,15
	200	199,43	8,761	4,39	-0,28

Dados: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo.

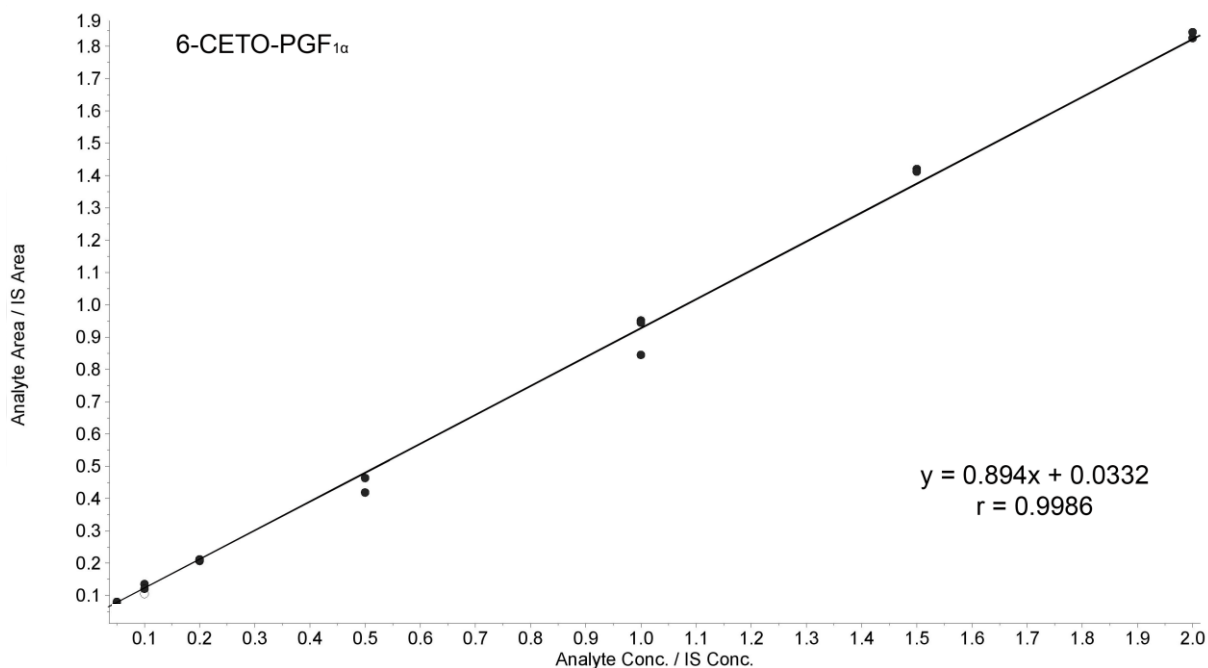


FIGURA 24 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 6-CETO-PGF_{1α}, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em meio DMEM, em triplicata e em sete níveis de concentração.

TABELA 16– VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 6-CETO-PGF_{1α}

COMPOSTO	Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)	Concentração determinada (ng.mL ⁻¹)	Desvio padrão (ng.mL ⁻¹)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
6-CETO-PGF _{1α}	5	5,17	0,079	1,53	3,42
	10	10,57	1,155	10,93	5,68
	20	19,73	0,295	1,50	-1,36
	50	45,63	3,570	7,82	-8,74
	100	98,48	6,672	6,77	-1,52
	150	154,75	0,636	0,41	3,17
	200	201,56	1,459	0,72	0,78

Dados: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo.

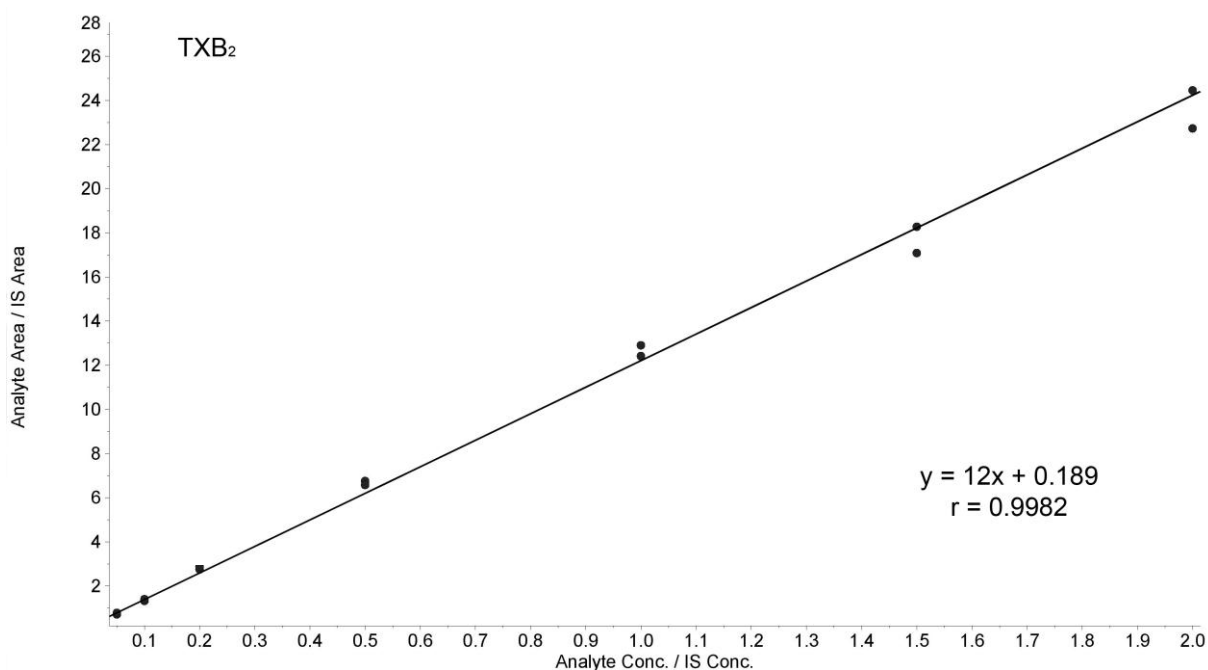


FIGURA 25 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA TXB₂, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em meio DMEM, em triplicata e em sete níveis de concentração.

TABELA 17– VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA TXB₂

COMPOSTO	Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)	Concentração determinada (ng.mL ⁻¹)	Desvio padrão (ng.mL ⁻¹)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
TXB ₂	5	4,54	0,301	6,63	-9,22
	10	9,74	0,330	3,39	-2,63
	20	21,79	0,745	3,42	8,94
	50	53,59	0,859	1,60	7,18
	100	103,72	2,901	2,80	3,72
	150	145,50	7,029	4,83	-3,00
	200	194,70	10,134	5,21	-2,65

Dados: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo.

5.4.4 Efeito Residual

Os cromatogramas obtidos com a amostra branco, após as injeções de amostras preparadas no nível mais alto de concentração da curva de calibração, estão apresentados nas Figuras 26, 27 e 28. Conforme demonstrado, nenhum pico interferente significativo foi observado no mesmo tempo de retenção dos analitos e do padrão interno, não havendo, portanto, risco de contaminação causada pelo arraste dos analitos entre as injeções.

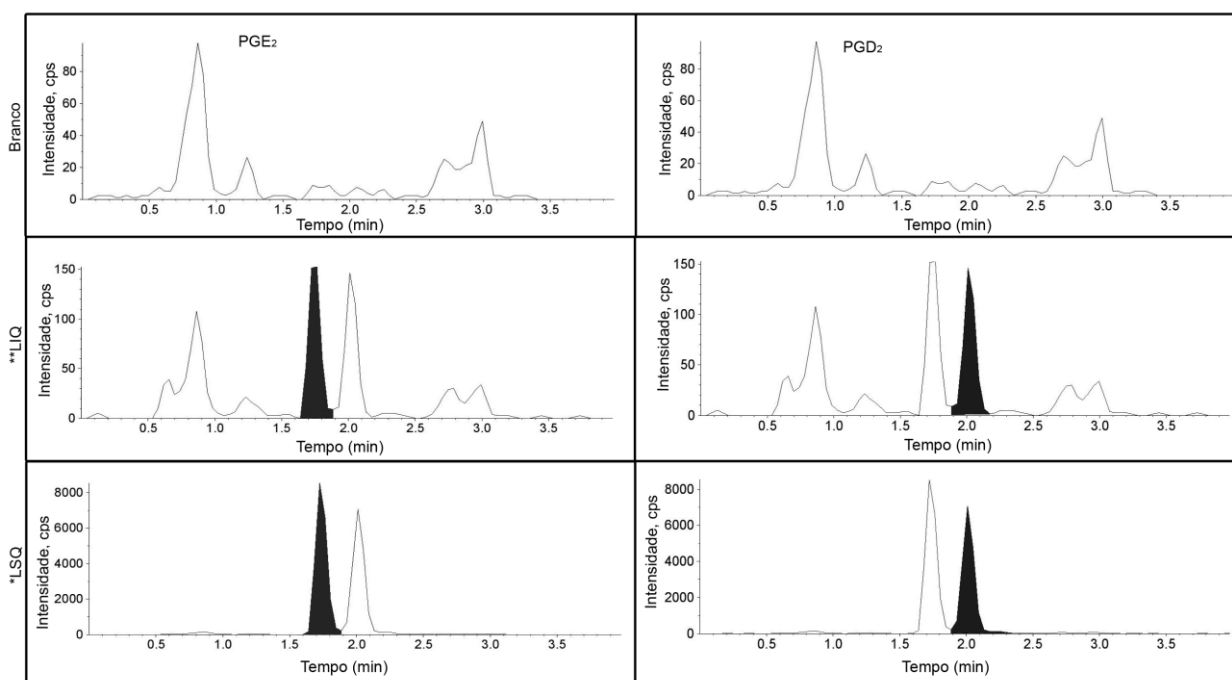


FIGURA26 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) PARA O ESTUDO DO EFEITO RESIDUAL PGE₂ e PGD₂. Dados: *amostra branco fortificada com analitos na concentração do LSQ; ** amostra branco fortificada com analitos na concentração do LIQ.

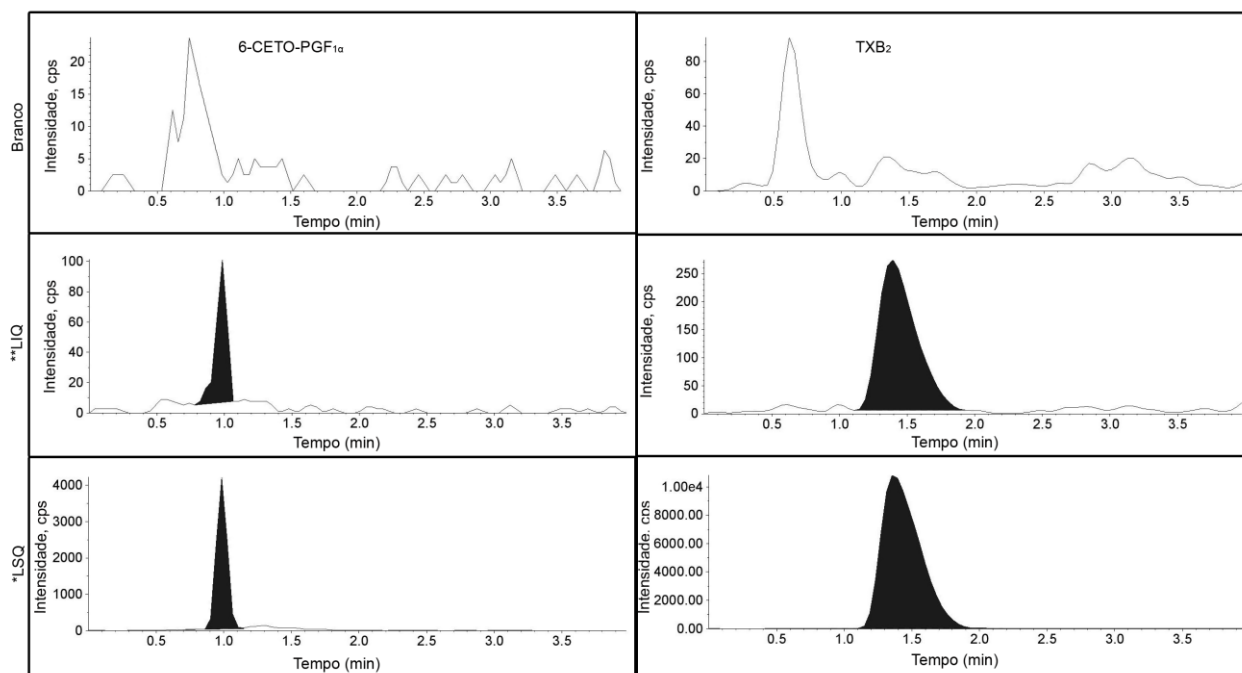


FIGURA 27 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) PARA O ESTUDO DO EFEITO RESIDUAL 6-CETO-PGF_{1α} e TXB₂. Dados: *amostra branco fortificada com analitos na concentração do LSQ; ** amostra branco fortificada com analitos na concentração do LIQ.

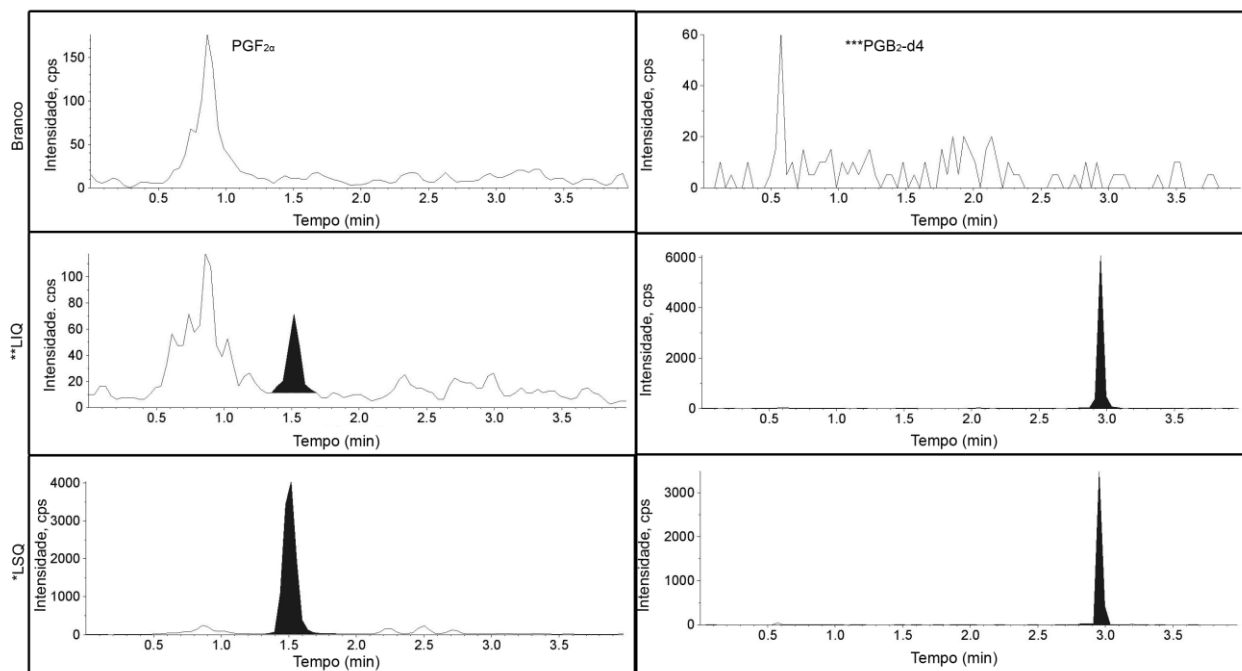


FIGURA 28 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) PARA O ESTUDO DO EFEITO RESIDUAL PGF_{2α} e PGB₂-d₄. Dados: *amostra branco fortificada com analitos na concentração do LSQ; ** amostra branco fortificada com analitos na concentração do LIQ; *** padrão interno.

5.4.5 Efeito matriz

Os resultados do teste de efeito matriz encontram-se na Tabela 18. Pode-se verificar que o valor do fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN) de cada analito encontra-se abaixo de 15% (quinze por cento). Esses resultados mostram que o efeito da matriz biológica nas respostas do analito e do padrão interno não é significativo.

TABELA 18– VARIAÇÃO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO POR PADRÃO INTERNO (FMN) DE PGE₂, PGD₂, TXB₂, PGF_{2α} E 6-CETO-PGF_{1α} CALCULADO PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ

Compostos	Nível de concentração (ng.mL ⁻¹)	FMN*	Média os FMNs ± dp	CV% (FMN)
PGE ₂	10	1,25 ± 0,07	1,22 ± 0,05	3,74
	150	1,19 ± 0,03		
PGD ₂	10	1,10 ± 0,10	1,16 ± 0,09	7,49
	150	1,23 ± 0,04		
TXB ₂	10	1,15 ± 0,03	1,16 ± 0,01	0,61
	150	1,16 ± 0,06		
PGF _{2α}	10	1,11 ± 0,07	1,14 ± 0,05	4,76
	150	1,18 ± 0,05		
6-CETO-PGF _{1α}	10	1,09 ± 0,12	1,08 ± 0,02	1,70
	150	1,06 ± 0,07		

Dados: *FMN, Fator de matriz normalizado por padrão interno calculado de acordo com a Equação 5(seção 6.8.7)

5.4.6 Precisão e exatidão

Os resultados da precisão e exatidão encontram-se na Tabela 19. Conforme pode ser observado, para todos os níveis de concentração avaliados, as variações de precisão (CV%) e exatidão (ER%) foram menores do que os 15% preconizados pela legislação vigente (BRASIL, 2012). Portanto, este método é considerado preciso e exato.

TABELA 19– VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS ATRAVÉS DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS POR CLAE-EM/EM

Compostos	Amostra Controle	Exatidão		Precisão		
		Concentração nominal (ng.mL ⁻¹)	Média Intra-dia (ER%)	Média Inter-dia (ER%)	Média Intra-dia (CV%)	Média Inter-dia (CV%)
PGE ₂	CQ-LIQ	5	-2,45	2,11	6,79	5,23
	CQB	10	-1,40	2,48	12,37	8,33
	CQM	100	-0,68	-2,58	8,22	6,73
	CQA	150	-3,35	-1,47	11,70	6,92
	CQD	100**	-2,52	-6,02	7,79	5,66
PGD ₂	CQ-LIQ	5	-3,05	0,83	8,80	6,65
	CQB	10	3,16	3,54	6,72	4,08
	CQM	100	2,14	1,42	3,69	5,43
	CQA	150	2,60	0,69	6,07	6,65
	CQD	100**	2,92	-4,00	3,68	4,24
TXB ₂	CQ-LIQ	5	-4,48	2,28	11,23	6,87
	CQB	10	-3,33	2,68	6,00	4,50
	CQM	100	6,00	0,48	3,27	5,33
	CQA	150	2,53	0,82	5,31	5,84
	CQD	100**	-1,90	-6,79	10,71	6,60
PGF _{2α}	CQ-LIQ	5	-4,10	-1,91	10,43	7,65
	CQB	10	-1,34	1,66	7,89	6,80
	CQM	100	6,33	0,94	6,20	6,05
	CQA	150	-0,42	-5,16	11,79	8,87
	CQD	100**	8,40	5,27	2,49	5,13
6-CETO-PGF ₁	CQ-LIQ	5	4,22	3,12	7,23	6,38
	CQB	10	6,80	2,20	4,89	4,02
	CQM	100	7,00	1,75	4,90	4,58
	CQA	150	0,72	-3,37	6,56	6,28
	CQD	100**	4,14	-2,43	5,48	5,63
*PGB ₂ -d4	-	100	0,72	1,05	4,70	5,47

Dados: CQ-LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: Controle de qualidade de baixa concentração; CQM: Controle de qualidade de média concentração; CQA: Controle de qualidade de alta concentração; ER%: erro relativo; CV%: coeficiente de variação; *Padrão interno; **Valor nominal após diluição de 5 vezes.

5.4.7 Estabilidade

Os resultados da estabilidade das substâncias de interesse em solução e em meio DMEM encontram-se nas Tabelas 20 e 21. Nessas tabelas é possível observar que as soluções de trabalho permaneceram estáveis por 3 horas na bancada, enquanto que as soluções estoque foram estáveis por 20 dias em *freezer* (-40 °C). Os analitos também foram estáveis quando permaneceram em contato com a matriz biológica por um período de 3 horas na bancada (21 °C) e 5 horas no gerenciador de amostras (3 °C). O estudo de estabilidade de longa duração mostrou que as substâncias armazenadas em *freezer* (-40 °C) não sofrem degradação significativa em 20 dias e não houve comprometimento da estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento (24 horas cada ciclo).

TABELA 20 – ESTABILIDADE DA PGE₂, PGD₂ E TXB₂ NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO (n = 6)

ESTABILIDADE			PGE ₂		PGD ₂		TXB ₂	
			Nível de concentração 10 ng.mL ⁻¹	Nível de concentração 150 ng.mL ⁻¹	Nível de concentração 10 ng.mL ⁻¹	Nível de concentração 150 ng.mL ⁻¹	Nível de concentração 10 ng.mL ⁻¹	Nível de concentração 150 ng.mL ⁻¹
SOLUÇÃO	3h bancada (21°C)	Recuperação (ng.mL ⁻¹ ± dp)	9,4±0,5	142,1±9,6	10,1±0,8	141,5±9,6	9,6±0,4	138±2,3
		CV (%)	4,98	6,74	7,86	6,77	3,70	1,64
		ER (%)	-6,00	-5,25	1,07	-5,70	-4,43	-7,77
	Longa duração (20 dias)	Recuperação (ng.mL ⁻¹ ± dp)	9,2±0,2	145,1±7,6	11,1±0,5	145,5±10,0	9,9±0,8	145±3,3
		CV (%)	6,95	8,74	5,24	7,87	7,80	5,64
		ER (%)	-2,00	-2,25	2,09	-4,50	-2,73	-8,75
MATRIZ	Curta duração (3h)	Recuperação (ng.mL ⁻¹ ± dp)	9,5±1,3	138,2±11,8	9,0±0,9	141,3±12,4	10,1±0,6	148,7±6,8
		CV (%)	13,37	8,55	9,65	8,75	6,39	4,60
		ER (%)	-4,94	-7,84	-10,09	-5,80	1,26	-0,84
	Pós- Processa- mento (5h)	Recuperação (ng.mL ⁻¹ ± dp)	9,2±1,3	142,5±8,2	9,3±1,0	129,6±11,1	8,6±0,4	131,0±8,1
		CV (%)	14,38	5,73	10,31	8,55	4,96	6,18
		ER (%)	-8,01	-4,99	-7,27	-13,61	-14,25	-12,66
	3 ciclos de descong elamento (24h)	Recuperação (ng.mL ⁻¹ ± dp)	9,1±0,5	137,9±14,9	10,1±0,7	145,6±8,6	10,3±0,7	150,5±4,2
		CV (%)	5,29	10,78	6,83	5,91	6,94	2,81
		ER (%)	-8,61	-8,09	1,11	-2,92	3,46	0,31
	Longa duração (20dias)	Recuperação (ng.mL ⁻¹ ± dp)	10,0±1,3	152,3±4,9	9,4±0,7	143,1±6,0	10,1±0,6	148,5±2,6
		CV (%)	12,54	3,25	7,95	4,18	6,04	1,73
		ER (%)	-0,05	1,53	-9,34	-4,57	1,13	-0,99

Dados: Temperatura do ciclos de descongelamento e longa duração ocorreram à -40°C. dp, desvio padrão; CV, coeficiente de variação; ER, erro relativo;

TABELA 21 – ESTABILIDADE DA PGF_{2α}, 6-CETO-PGF_{1α} E PGB₂-d4 NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO (n = 6)

ESTABILIDADE			PGF _{2α}		6-CETO-PGF _{1α}		PGB ₂ -d4
			Nível de concentração 10 ng.mL ⁻¹	Nível de concentração 150 ng.mL ⁻¹	Nível de concentração 10 ng.mL ⁻¹	Nível de concentração 150 ng.mL ⁻¹	Nível de concentração 150 ng.mL ⁻¹
SOLUÇÃO	3h bancada (21°C)	Recuperação (ng.mL ⁻¹ ± dp)	10,5±1,1	159,6±11,5	9,8±1,3	150,7±2,7	141,3±4,9
		CV (%)	10,13	7,19	13,56	1,76	3,46
		ER (%)	5,46	6,41	-2,00	0,48	-5,81
	Longa duração (20 dias)	Recuperação (ng.mL ⁻¹ ± dp)	9,8±0,9	157,6±12,7	10,0±0,7	149,7±2,5	140,1±3,2
		CV (%)	11,13	3,14	7,56	2,78	5,46
		ER (%)	6,49	8,51	-1,00	1,48	-6,72
MATRIZ	Curta duração (3h)	Recuperação (ng.mL ⁻¹ ± dp)	9,0±0,9	129,7±7,6	11,1±0,9	155,0±4,0	136,4±11,5
		CV (%)	10,10	5,84	8,10	2,56	8,42
		ER (%)	-9,77	-13,52	10,65	3,33	-9,04
	Pós- Processa- mento (5h)	Recuperação (ng.mL ⁻¹ ± dp)	10,1±0,6	152,5±8,9	9,5±1,0	145,6±2,2	128,9±8,3
		CV (%)	6,14	5,81	10,00	1,52	6,41
		ER (%)	1,21	1,64	-4,69	-2,93	-14,04
	3 ciclos de descong elamento (24h)	Recuperação (ng.mL ⁻¹ ± dp)	10,6±1,2	158,3±12,2	10,1±1,1	145,7±10,0	N/A
		CV (%)	11,11	7,71	11,01	6,83	N/A
		ER (%)	5,85	5,56	0,93	-2,85	N/A
	Longa duração (20dias)	Recuperação (ng.mL ⁻¹ ± dp)	10,0±0,8	148,8±7,5	10,3±0,9	158,8±6,6	N/A
		CV (%)	8,12	5,05	8,61	4,16	N/A
		ER (%)	-0,44	-0,82	3,08	5,86	N/A

Dados: Temperatura do ciclos de descongelamento e longa duração ocorreram à -40°C. dp, desvio padrão; CV, coeficiente de variação; ER, erro relativo; N/A, não se aplica

6. CONCLUSÃO

O método desenvolvido por CLAE-EM/EM é apropriado para a quantificação dos eicosanóides PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ e TXB_2 em meio de cultivo celular DMEM e capaz de separar corretamente os isômeros PGE_2 e PGD_2 , com um tempo de corrida baixo (4 minutos) comparado aos métodos existentes (média de 13 minutos por análise). O método também mostrou-se seletivo, livre de efeitos residuais e de matriz, linear, preciso, exato, e os analitos apresentaram estabilidade aceitáveis, nas condições avaliadas, de acordo com a resolução publicada pela ANVISA, RDC N. 27, de 17 de maio de 2012.

O método mostrou-se econômico, tendo em vista que apresenta tempo de corrida reduzido e utiliza extração via líquido-líquido no preparo de amostra, que sabidamente é uma técnica mais rápida, simples e barata se comparada à extração em fase sólida. A extração líquido-líquido reduziu consideravelmente o tempo de preparo de amostra diminuindo também a degradação sofrida pelos analitos no período de processamento de amostra obtendo-se recuperação adequada (mínimo de 70,49 %) e superior a extração em fase sólida para todos os analitos em estudo.

Este método contribui também para a minimização do impacto ambiental por apresentar um baixo consumo de solvente orgânico, que é ocasionado pelo curto tempo de corrida.

Outras vantagens do método analítico é que ele utiliza colunas C-18 (4,6 x 50 mm, com 1,8 μm de tamanho de partícula) facilmente encontradas em laboratórios analíticos e pode ser aplicado a diferentes tipos de células cultiváveis em meio DMEM, tendo em vista a similaridade da matriz biológica utilizada.

7. REFERÊNCIAS

AHN, K. S.; NOH, E. J.; CHA, K. H.; KIM, Y. S.; LIM, S. S.; SHIN, K. H.; JUNG, S. H. Inhibitory effects of Iridogenin from the rhizomes of *Belamcanda chinensis* on nitric oxide and prostaglandin E2 production in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Life Sciences**, v. 78, p. 2336 – 2342, 2006.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. **Cultivo Celular**. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde PAIXÃO, M. 2: 253 p. 2010.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci**, v. 78, n. 5, p. 431-41, Dec 22 2005.

BLAHOVÁ, E.; BRANDSTETEROVÁ, E. Approaches in sample handling before HPLC analysis of complex matrices. **Chemical Papers**, v. 58, n. 5, p.362-373, 2004.

BLEWETT, A. J. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry method for the simultaneous determination of 23 eicosanoids. **J Pharm Biomed Anal**, v. 46, n. 4, p. 653-62, Mar 13 2008.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução n 899 de 29 maio de 2003 que determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 fev. de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília - DF, 2012.

BROWNAB, G. P.; VENUTO, R. C. [Thromboxane receptors in human kidney tissues](#). **Prostag Oth Lipid M**, v. 57, n. 4, p. 179-188, jun. 1999.

BUCCELLATI, C.; FUMAGALLI, F.; VIAPPIANI, S.; FOLCO, G. [Leukotriene modifiers: novel therapeutic opportunities in asthma](#). **Farmaco**, v. 57, n. 3, p. 235-242, mar. 2002,

BUFFON, M. C. M.; LIMA, M. L. C.; GALARDA, I.; COGO, L. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma*

zedoarea no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “*in vitro*”. **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, n. 1, p. 31-38, 2001.

CAO, H. et al. An improved LC-MS/MS method for the quantification of prostaglandins E(2) and D(2) production in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 372, n. 1, p. 41-51, Jan 1 2008.

CECH, N. B.; ENKE, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrom Rev**, v. 20, n. 6, p. 362-87, Nov-Dec 2001.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 21, p. 13926-31, Oct 15 2002.

CHAPPELL, D. L. et al. Development and validation of a LC/MS/MS method for 6-keto PGF1alpha, a metabolite of prostacyclin (PGI(2)). **J Pharm Biomed Anal**, v. 56, n. 3, p. 600-3, Nov 1 2011.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, v. 31, p. 623-636, 2008.

CORRÊA, A. M. D. S.; BARROS, M. A. V. D. C. Flora Polínica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil): Famílias: 67-Ericaceae, 96-Olacaceae e 126-Trigoniaceae. **Hoehnea**, v. 38, p. 109-113, 2011.

CRUZ-MACHADO, S. S. Lipopolissacarídeo (lps): ativador e regulador da Transcrição gênica via fator de transcrição nfkb. **Revista Da Biologia**, v. 4, p. 40-43, 2010.

CUETARA, B. L. et al. Cloning and characterization of osteoclast precursors from the RAW264.7 cell line. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 42, n. 7, p. 182-8, Jul-Aug 2006.

DASS, C. **Fundamentals Of Contemporary Mass Spectrometry**. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2007. 586 p.

DE CATERINA, R.; ZAMPOLLI, A. From asthma to atherosclerosis--5-lipoxygenase, leukotrienes, and inflammation. **N Engl J Med**, v. 350, n. 1, p. 4-7, Jan 1 2004.

DEEMS, R.; BUCZYNSKI, M. W.; BOWERS-GENTRY, R.; HARKEWICS, R.; DENNIS, E. A. Detection and Quantitation of Eicosanoids via High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Method Enzymol*, v. 432, p. 59-82, 2007.

DE SOUZA, L. M. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. Curitiba, 2008. 182 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

DIAMANT, Z.; BEL, E. H.; DEKHUIJZEN, P. N. R. [Anti-leukotriene therapy in asthma](#). **Neth J Med**, v. 53, n. 4, p. 176-189, out. 1998.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology. John Wiley & Sons Ltda., 1998.

EDPUGANTI, V.; MEHVAR, R. UHPLC-MS/MS analysis of arachidonic acid and 10 of its major cytochrome P450 metabolites as free acids in rat livers: Effects of hepatic ischemia. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, Aug 14 2013.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation**. United States Department of Health and Human Services, 2013.

FERREIRA, H. S. **Medicamentos: A partir de plantas medicinais no Brasil**, 1998. 181 p.

FLORASBS. Solanum diploconos - Baga-de-bugre. Disponível em: <https://sites.google.com/site/florasbs/solanaceae/baga-de-bugre>. Acesso em: 06 de ago. 2014.

FRESHNEY, R. I. Introduction. In: **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. 4. ed. New York: Wiley-Liss, 2000.

GIACOMIN, L. L. **Estudos taxonômicos e filogenéticos em Solanum sect. Gonatotrichum bitter (solanoideae, solanaceae) no brasil**. Belo Horizonte, 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Departamento de Botânica, Universidade Federal De Minas Gerais

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 2, p. 140-50, fev. 2003.

GREENE, E. R.; HUANG, S.; SERHAN, C. N.; PANIGRAHY, D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. **Prost Lipid Med**, v. 96, n. 1-4, p. 27-36, nov. 2011.

GROVER, J. et al. Synthesis, biological evaluation, molecular docking and theoretical evaluation of ADMET properties of nepodin and chrysophanol derivatives as potential cyclooxygenase (COX-1, COX-2) inhibitors. **Eur J Med Chem**, v. 80C, p. 47-56, Apr 13 2014.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2004. 518 p.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med**, v. 27, n. 1, p. 1-93, Feb 2006.

HAMILTON, J. G.; KAROL, R. J. High performance Liquid Chromatography (HPLC) of arachidonic acid metabolites. **Prog Lipid Res**, v. 21, n. 3, p. 155-170, 1983

HIKIJ, H. et al. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Prog Lipid Res**, v. 47, n. 2, p. 107-26, Mar 2008.

HISHINUMA, T. SUZUKI, K.; MASAYOSHI, S.; YAMAGUCHI, H.; SUZUKI, N.; YOSHIHISA T.; KANEKO, I.; ONO, M.; GOTO, J. Simultaneous quantification of seven prostanoids using liquid chromatography/tandem mass spectrometry: The effects of arachidonic acid on prostanoid production in mouse bone marrow-derived mast cells. **ProstagLeukotrEss**, v. 76, n. 6, p. 321-329, jun. 2007.

HOLGATE, S. T.; BRADDING, P.; SAMPSON, A. P. [Leukotriene antagonists and synthesis inhibitors: New directions in asthma therapy.](#) **J Allergy Clin Immun**, v. 98, n. 1, p. 1-13, jul. 1996.

HOUSSEN, M. E.; RAGAB, A.; MESBAH, A.; EL-SAMANOUDY, A. Z.; OTHMAN, G.; FATHY, A.; BADRIA, F. A. Natural anti-inflammatory products and leukotriene inhibitors as complementary therapy for bronchial asthma. **Clin Biochem**, v. 43, n. 10-11, p. 887-890, jul. 2010.

HUANG, Y. et al. Mass spectrometry-based metabolomic profiling identifies alterations in salivary redox status and fatty acid metabolism in response to inflammation and oxidative stress in periodontal disease. **Free Radic Biol Med**, v. 70C, p. 223-232, Mar 6 2014.

HUNT, J. A.; MERRITT, J. E.; MACDERMOT, J.; KEEN, M. Characterization of the thromboxane receptor mediating prostacyclin release from cultured endothelial cells. **Biochem Pharmacol**, v. 43, n. 8, p. 1747-1752, abr. 1992.

IBRAHIM, M. A. et al. Anti-trypanosomal activity of African medicinal plants: A review update. **J Ethnopharmacol**, Apr 14 2014.

IGLESIAS, A. H. Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massas. Disponível em <http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20ao%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20-%20espectrometria%20de%20massas.pdf>. Acesso em 7 de out. 2014.

ISHIZUTA, T.; KAWAKAMI, M.; HIDAKA, T. MATSUKI, Y.; TAKAMIZAWA, M.; SUZUKI, K. et al. Stimulation with thromboxane A2 (TXA2) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells. **Clin Exp Immunol**, v. 112, n. 3, p. 464-470, jun. 1998.

IYU, D. et al. PGE1 and PGE2 modify platelet function through different prostanoid receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 94, n. 1-2, p. 9-16, Feb 2011.

JEONG, G. S.; LEE, S. H.; JEONG, S. N.; KIM, Y. C.; KIM, E. C. Anti-inflammatory effects of apigenin on nicotine- and lipopolysaccharide-stimulated human periodontal ligament cells via heme oxygenase-1. **Int Immunopharmacol**, v. 9, n. 12, p. 1374-1380, nov. 2009.

JEON, C. M. et al. *Siegesbeckia glabrescens* attenuates allergic airway inflammation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells and OVA induced asthma murine model. **Int Immunopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 414-9, Oct 2014.

KASILO, OSSY M.J. & TRAPSIDA, JEAN-MARIE.2010. Regulation of traditional medicine in the WHO African region. **The African health monitor**. 25-31. [Electronic]. Available: http://afrolib.afro.who.int/documents/2010/En/AHMSI_25_31.PDF [2011, July 06].

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p.232-244, 2003.

KATUGAMPOLA, S. D.; DAVENPORT, A. P. Thromboxane receptor density is increased in human cardiovascular disease with evidence for inhibition at therapeutic concentrations by the AT1 receptor antagonist losartan. **Br J Pharmacol**, v. 134, n. 7, p. 1385–1392, dez. 2001.

KIM, S. et al. Upregulation of heme oxygenase-1 by ginsenoside Ro attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophage cells. **Journal of Ginseng Research**, v. 39, n. 4, p. 365-370, 2015.

KORTZ, L.; DOROW, J.; CEGLAREK, U. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of eicosanoids and related lipids in human biological matrices: a review. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 964, p. 1-11, Aug 1 2014.

LAURENCE L. BRUNTON, JOHN S. LAZO, KEITH L. PARKER; **Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica**; 11^a edição; McGraw Hill; Rio de Janeiro; 2006

LEE, S. J.; HOSSAINE, M. D. A.; PARK, S. C. A potential anti-inflammation activity and depigmentation effect of *Lespedeza bicolor* extract and its fractions. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2015.

LIN, I. C.; KUO, C. D. Pro-inflammatory effects of commercial alpha-lactalbumin on RAW 264.7 macrophages is due to endotoxin contamination. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2642–2649, 2010

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de periodontia Clínica e implantologia Oral**. Guanabara Koogan, quinta edição, Rio de Janeiro, 2010.

LU, N. et al. I4, a new synthetic sulfonylurea compound, inhibits the action of TXA2 in vivo and in vitro on platelets and aorta vascular smooth muscle. **Thromb Res**, v. 130, n. 4, p. e209-15, Oct 2012.

MADDIPATI, K. R.; ZHOU, S. L. Stability and analysis of eicosanoids and docosanoids in tissue culture media. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 94, n. 1-2, p. 59-72, Feb 2011.

MARTINELLI, G.; MORAES, A. M. **Livro Vermelho Da Flora Do Brasil**. 1 edição. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, 2013. 1100 p.

MARTINS, C. A. F. P., R. Desenvolvimento e validação de um método por CLAE-EM/EM para determinação de PGE2 e PGD2 em meio de cultivo celular e avaliação da recuperação das prostaglandinas utilizando diferentes condições na extração em fase sólida. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 2, p. 183-189, 2013.

MARTIN-VENEGAS, R.; JAUREGUI, O.; MORENO, J. J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of eicosanoids and related compounds in cell models. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 964, p. 41-9, Aug 1 2014.

MARTINS, C. A. F. **Avaliação da participação da prostaglandina-e₂ na resposta anti-inflamatória do extrato de malva sylvestris**. Curitiba, 2013. 113 F. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – setor de ciências da saúde, Universidade Federal do Paraná.

MASOODI, M.; NICOLAOU, A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 20, n. 20, p. 3023-9, 2006.

MESAROS, C.; LEE, S. H.; BLAIR, I A. Targeted quantitative analysis of eicosanoid lipids in biological samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 877, p. 2736–2745, 2009.

MILLER, S. B. Prostaglandins in Health and Disease: An Overview. **Semin Arthritis Rheu**, v. 36, n. 1, p. 37-49, ago. 2006.

MONTUSCHI, P. et al. Liquid chromatography-mass spectrometry measurement of leukotrienes in asthma and other respiratory diseases. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, Mar 12 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUBARAK, K. K. A review of prostaglandin analogs in the management of patients with pulmonary arterial hypertension. **Resp Med**, v. 104, n. 1, p. 9-21, jan. 2010.

MURPHY, R. C.; BARKLEY, R. M.; BERRY, K. Z.; HANKIN, J.; HARRISON, K.; JOHNSON, C.; KRANK, J.; McANROY, A.; UHLSON, C.; ZARINI, S. Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. *Anal Biochem*, v. 346, n. 1, p. 1-42, nov. 2005.

NAKAHATA, N. Thromboxane A₂: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacol Therapeut**, v. 118, n. 1, p. 18-35, abr. 2008,

NIE, D.; LAMBERTI, M.; ZACHAREK, A.; LI, L., SZEKERES, K.; TANG, K.; et al. Thromboxane A₂ regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 267, n. 1, p. 245-251, jan. 2000.

NIESSEN, W. M. A. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **J Chromatogr A**, v. 1000, n. 1-2, p. 413-436, jun. 2003.

NITHIPATIKOM, K.; LAABS, N. D.; ISBELL, M. A.; CAMPBELL, W. B. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of cyclooxygenase metabolites of arachidonic acid in cultured cells. **J Chromatogr B**, v. 785, n. 1, p. 135-145, fev. 2003.

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1, p. 8-35, 2009.

PAIXÃO, C. C. B.; SANTOS, A. A.; OLIVEIRA, C. C. C.; SILVA, L. G. NUNES, M. A. R. Uso de plantas medicinais em pacientes portadores de afecções bucais. **Odontologia Clínico-Científica**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2002.

PATEL, D. Matriz effect in a view of LC-MS/MS: An overview. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 1, p.559-564, 2011.

PEREIRA-SMITH, O. M.; SMITH, J. R. Genetic analysis of indefinite division in human cells: identification of four complementation groups. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, n. 16, p. 6042-6046, 1988.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PILBEAM, C. C.; CHOUDHARY, S.; BLACKWELL, K.; RAISZ, L. G. Prostaglandins and bone metabolism. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; JOHN MARTIN, T. **Principles of bone biology**. AP, 2007. p. 1235-1271.

POWEL, W. S. Extraction of Eicosanoids from Biological Fluids, Cells, and Tissues. In: **Eicosanoid Protocols**. New Jersey: Humana Press, 1999. P. 11-15.

PUPPOLO, M.; VARMA, D.; JANSEN, S. A. A review of analytical methods for eicosanoids in brain tissue. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 964, p. 50-64, Aug 1 2014.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J **Farmacologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REDDANNA, P.; PRABHU, K. S.; WHELAN, J.; REDDY, C. C. Carboxypeptidase A-catalyzed direct conversion of leukotriene C4 to leukotriene F4. **Arch Biochem Biophys**, v. 413, n. 2, p. 158-163, maio 2003.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICHTER, S.; GOLDBERG, S. A.; MASON, P. B. TRAINA, A. J., SCHWIETERS, J. B. Linearity tests for secondary electron multipliers used in isotope ratio mass spectrometry. **Int J Mass Spectrom**, v. 206, n. 1-2, p 105-127, fev. 2001.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual review of pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas: parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 981-991, 2010.

ROGUET, R.; SCHAEFER, H. Overview of in vitro cell culture technologies and pharmaco-toxicological applications. **Toxicol in Vitro**, v. 11, n. 5, p. 591-599, out. 1997.

ROSENBLAT, J. D. et al. Inflamed moods: A review of the interactions between inflammation and mood disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 53C, p. 23-34, Jan 25 2014.

RUAN, G. X. et al. Macrophage mannose receptor-specific gene delivery vehicle for macrophage engineering. **Acta Biomater**, v. 10, n. 5, p. 1847-55, May 2014.

SALES, K. J.; JABBOUR, H. N. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in reproductive tract physiology and pathology. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 71, n. 3-4, p. 97-117, 2003.

SATO, K.; KAWASHITA, K. Espectrometria de massas em geologia isotópica. **Geologia USP. Série Científica**, v. 2, p. 57-77, 2002.

SAZIMA, M; VOGEL. Et al. The perfume flowers of Cyphomandra (Solanaceae): pollination by euglossine bees, bellows mechanism, osmophores, and volatiles. **Plant Systematics And Evolution**, v. 187, p. 51-88, 1993.

SCHMIDT, R.; COSTE, O.; GEISLINGER, G. LC-MS/MS-analysis of prostaglandin E₂ and D₂ in microdialysis samples of rats. **J Chromatogr B**. v. 826, n. 1-2, p. 188-197, nov. 2005.

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Effects of plant lectins on in vitro fibroblast proliferation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 3, p. 349-354, 2003.

SHAH, V. P. The history of bioanalytical method validation and regulation: Evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation. **The APPS Journal**, v. 9, n. 1, p. 43-47, 2007.

SHIN, J. S. et al. Sulfuretin isolated from heartwood of Rhus verniciflua inhibits LPS-induced inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and pro-inflammatory cytokines expression via the down-regulation of NF-kappaB in RAW 264.7 murine macrophage cells. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 8, p. 943-50, Aug 2010.

SHIRAZAKI, H.; KIKUCHI, M.; SEKI, N.; KANAIZUMI, E.; WATANABE, K.; HIMI, T. Expression and localization of the thromboxane A2 receptor in human nasal mucosa. **Prostag Leukotr Ess**, v. 76, n. 6, p. 315-320, jun. 2007.

SILVA, A. de P.; ALVES, M. C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. Enqualab, 2006. **Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia Rede Metrológica do Estado de São Paulo – REMESP**, p. 8-15, jun. 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da Universidade/UFRGS, 5.ed, 2003, 1102p.

SOARES, E. L. C; MENTZ, L. A. As espécies de solanum subgênero bassovia Seção pachyphylla (= cyphomandra mart. Ex Sendtn. - solanaceae) no rio grande do sul, Brasil. **Pesquisas, Botânica**, v. 57, p. 231-254, 2006.

SPURNEY, R. F.; ONORATO, J. J.; ALBERS, F. J.; COFFMAN, T. M. Thromboxane binding and signal transduction in rat glomerular mesangial cells. **Am J Physiol**, v. 264, n. 2, p. 292-299, fev. 1993.

SURETTE, M. E.; KOUMENIS, I. L.; EDENS, M. B.; TRAMPOSH, K. M. CHILTON, F. H. Inhibition of leukotriene synthesis, pharmacokinetics, and tolerability of a novel dietary fatty acid formulation in healthy adult subjects. **Clin Ther**, v. 25, n. 3, p. 948-97, mar. 2003.

TAKABATAKE, M.; HISHINUMA, T.; SUZUKI, N.; CHIBA, S.; TSUKAMOTO, H.; NAKAMURA H.; SAGA, T.; TOMIOKA, Y.; KUROSE, A.; SAWAY, T. MIZUGAKI, M. Simultaneous quantification of prostaglandins in human synovial cell-cultured medium using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Prostag Leukotr Ess**, v. 67, n. 1, p. 51-56, jul. 2002.

TSAI, W. C.; TANG, F. T.; HSU, C. C.; HSU, Y. H.; PANG, J. H.; SHIUE, C. C. Ibuprofen inhibition of tendon cell proliferation and upregulation of the cyclin kinase inhibitor p21CIP1. **J Orthopaedic Res**, v. 22, n. 3, p. 586-591, maio 2004.

TSIKAS, D.; ZOERNER, A. A. Analysis of eicosanoids by LC-MS/MS and GC-MS/MS: A historical retrospect and a discussion. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 964C, p. 79-88, Aug 1 2014.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. Synadenium umbellatum: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciencias Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 631-638, 2007.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2, p. 227-236, 7/6/ 2001.

WAL, P.; KUMAR, B.; BHANDARI, A.; RAI, A. K.; WAL, A. Bioanalytical method development-Determination of drugs in biological fluids. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 10, p. 333-347, 2010.

WANG, D.; DuBOIS, R. N. Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer. **Cancer Lett**, v. 267, n. 2, p. 197-203, ago. 2008.

WANG, Q. S. et al. Ethanol extract from a Chinese herbal formula, "Zuojin Pill", inhibit the expression of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages. **J Ethnopharmacol**, v. 141, n. 1, p. 377-85, May 7 2012.

YADAV, M.; DIXIT, P.; TRIVEDI, V.; GANDHI, A.; SENGHER, A.; GUTTIKAR, S.; SINGHAL, P.; SHRIVASTAV, P. S. Chromatographic separation of (*E*)- and (*Z*)-isomers of entacapone and their simultaneous quantitation in human plasma by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 5-6, p. 533-540, 15 fevereiro 2009.

YANG, H. J. et al. Psoralidin, a dual inhibitor of COX-2 and 5-LOX, regulates ionizing radiation (IR)-induced pulmonary inflammation. **Biochem Pharmacol**, v. 82, n. 5, p. 524-34, Sep 1 2011.

YOKOMIZO, T.; UOZUMI, N.; TAKAHASHI, T.; KUME, K.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. Leukotriene A₄ hydrolase and leukotriene B₄ metabolism J Lipid Mediat Cell, v. 12, n. 2-3, p. 321-332, out. 1995.

ZHOU, W.; LIOTTA, L. A.; PETRICIOIN, E. F. Cancer metabolism and mass spectrometry-based proteomics. **Cancer Lett**, Nov 18 2013.